

Borrelia burgdorferi- ja *Anaplasma phagocytophilum*- vasta-aineiden prevalenssi suomalaisilla hevosilla.

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Jasmin Joenperä

Immunologian oppiaine

Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2015



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare - Author Joenperä, Jasmin			
Työn nimi - Arbetets titel - Title <i>Borrelia burgdorferi</i> - ja <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -vasta-aineiden prevalenssi suomalaisilla hevosilla			
Oppiaine - Läroämne - Subject Immunologian oppiaine			
Työn laji - Arbetets art - Level Kokeellinen tutkimus	Aika - Datum - Month and year 05/2015	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 68	
<p>Tiivistelmä - Referat – Abstract</p> <p><i>Borrelia burgdorferi</i> ja <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ovat puutiaisvälitteisiä bakteereja. <i>B. burgdorferi</i> aiheuttaa ihmisille borreliooisia, mutta sen merkitystä hevosten taudinaiheuttajana ei täysin tunneta. <i>A. phagocytophilum</i> puolestaan aiheuttaa granulosityttistä anaplasmoosia ihmisillä, koiralla ja hevosella sekä laidunkuumetta märehitöillä. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia <i>Borrelia</i>- ja <i>Anaplasma</i>-vasta-aineiden yleisyyttä suomalaisilla hevosilla. Eri Euroopan maissa tehdyissä tutkimuksissa on todettu <i>Borrelia</i>-vasta-aineita noin 3-29 %:lla ja <i>Anaplasma</i>-vasta-aineita noin 9-73 %:lla hevosista. Suomessa aihetta ei ole aiemmin tutkittu tässä mittakaavassa. Hypoteesina oli, että hevosista löydetään vasta-aineita molempia taudinaiheuttajia vastaan erityisesti etelässä ja rannikkoalueilla sekä iäkkäillä ja Suomeen tuoduilla hevosilla.</p> <p>Tutkimuksessa kerättiin 281 varsojen ja 319 aikuisten hevosten verinäytettä Manner-Suomesta ja Ahvenanmaalta. Hevosienomistajilta pyydettiin lisäksi tietoja hevosesta kysymyslomakkeella. Näytteet tutkittiin koirien vektorivälitteisten tartuntojen diagnostiikkaan kehitettyä SNAP 4DX Plus –pikatestiä. Tulosten tilastollinen analyysi suoritettiin SPSS-ohjelmalla käyttäen yhden muuttujan logistista regressioanalyysiä ja ristiintaulukointia.</p> <p><i>Borrelia</i>-vasta-aineita todettiin 60/319 (18,8 %) aikuisella ja 11/281 (3,9 %) varsalla ja <i>Anaplasma</i>-vasta-aineita 20/319 (6,3 %) aikuisella ja 4/281 varsalla (1,4 %). Seroprevalenssit olivat korkeimmat Ahvenanmaalla (aikuisilla <i>Borrelia</i> 89,5 % ja <i>Anaplasma</i> 47,4 %), Etelä-Suomessa (25,5 % ja 4,9 %) sekä Itä-Suomessa (17,0 % ja 4,9 %). <i>Borrelia</i>-seropositiivisuuden kannalta tilastollisesti merkitseviä tekijöitä olivat hevosessa havaitut puutiaiset, alue, hevosen alkuperämaa, ikä, käyttötarkoitus, roturyhmä sekä <i>Anaplasma</i>-seropositiivisuus yhden muuttujan mallissa. <i>Anaplasma</i>-seropositiivisuuden kannalta mahdollisesti merkitseviä tekijöitä olivat puutiaiset, alue, hevosen alkuperämaa, ikä sekä <i>Borrelia</i>-seropositiivisuus.</p> <p>Tulosten perusteella <i>Borrelia burgdorferi</i>- ja <i>Anaplasma phagocytophilum</i> -tartuntoja esiintyy yleisesti suomalaisilla hevosilla. Tartuntapaine oli korkein Ahvenanmaalla sekä Etelä- ja Itä-Suomessa. Käytännössä bakteeria kantavan puutiaisen purema on ainoa syy tartuntaan, mutta taustatekijät kuten asuminen puutiaisen levinneisyysalueella tai ulkoileminen maastossa tai laitumella ja voivat altistaa hevosen puutiaisille ja siten <i>Borrelia</i>- tai <i>Anaplasma</i>-tartunnalle. Riskitekijöiden selvittäminen vaatii laajempaa tilastollista analyysiä ja esimerkiksi <i>Borrelia</i>-tartunnan mahdollista yhteyttä klinisiin oireisiin pitäisi selvittää lisätutkimuksin.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , borreliooosi, granulosityttinen anaplasmoosi, hevonen, seroprevalenssi, vasta-aine			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden talon (EE-talo) Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja: Professori Airi Palva, ohjaaja: Sami Junnikkala			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2.1 Vektori	2
2.1.1 Puutiaisen levinneisyys ja elinalueet.....	2
2.1.2 Puutiaisen elinkierto.....	3
2.1.3 Puutiaisen isäntäeläimet	5
2.1.4 Puutiaisen kantamat taudinaiheuttajat	5
2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	6
2.2.1 Lajit	6
2.2.2 <i>Borrelia</i> -bakteerin reservuaarit luonnossa	7
2.2.4 <i>Borrelia</i> -bakteerin genetiikka.....	8
2.2.5 <i>Borrelia</i> -bakteerin väistömekanismit ja patogeneesi	9
2.2.6 Seroprevalenssi eri maissa ja borrelioosin yleisyys Suomessa	10
2.2.7 Oireet hevosella.....	11
2.2.8 Serologia	12
2.2.9 Diagnostiikka hevosilla.....	13
2.2.10 Hoito ja ennaltaehkäisy	14
2.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	15
2.3.1 Variantit	15
2.3.2 Levinneisyys ja reservuaarit.....	15
2.3.3 Tartunta	16
2.3.4 <i>A. phagocytophilum</i> -bakteerin patogeneesi ja väistömekanismit.....	16
2.3.5 Seroprevalenssi eri maissa	17
2.3.6 Hevosen granulosityttisen anaplasmoosin oireet.....	18
2.3.7 Verenkuva ja patologiset muutokset	19
2.3.8 Serologia	19
2.3.9 Diagnoosi	20
2.3.10 Hoito ja ennaltaehkäisy	20
3.1 Aineisto	21
3.1.1 Yleistä	21
3.1.2 Varsojen näytteet.....	26
3.1.3 Aikuisten hevosten näytteet	26

3.2 Menetelmät.....	29
3.2.2. Näytteiden analysointi.....	29
3.2.3. Tilastollinen analyysi	31
4 TULOKSET	32
4.1 Yleistä	32
4.2 Varsat	32
4.3 Aikuiset	35
4.3.1 Muuttujien väliset riippuvuudet	43
5 POHDINTA	44
5.1 Tutkimuspopulaatio	44
5.2 Näytteenottoajankohta.....	46
5.3 Näytteiden käsittelyyn liittyvät tekijät	46
5.4 SNAP-testin käyttökelpoisuus hevosten puutiaisvälitteisten tartuntojen diagnostiikassa.	47
5.5 Seroprevalenssit	48
5.6 Muuttujien vaikutus seropositiivisuuteen.....	48
5.6.1 Puutiaisten havaitseminen	49
5.6.2 Alue.....	49
5.6.3 Alkuperämaa	50
5.6.4 Ikä.....	50
5.6.5 Rotu ja käyttötarkoitus	51
5.6.6 Laiduntaminen ja maastokäyttö	51
5.6.7 Seropositiivisuus toiselle tutkittavalle patogeenille	51
5.6.8 Oireet.....	52
5.7 Johtopäätökset	53
7 KIRJALLISUUS	54
LIITTEET	67
Liite I.....	67

1 JOHDANTO

Borrelia burgdorferi- ja *Anaplasma phagocytophilum* -vasta-aineiden yleisyys hevosilla oli kiinnostava tutkimuskohde, sillä asiasta ole aiemmin tehty Suomessa laajaa kartoitusta. Aiheesta on kuitenkin vastikään julkaistu koiria käsittelevä suomalainen tutkimus (Pérez Vera ym. 2014). *A. phagocytophilum* on tunnettu taudinaiheuttaja ihmisillä, koirilla, märehitijöillä ja hevosilla. Hevosten anaplasmoosi on tunnettu jo 1960-luvulta lähtien (Gribble 1969) ja suomalaisessa kirjallisuudessa on kuvattu yksi tautitapaus (Valkjärvi ym. 2010). Sen sijaan *B. burgdorferi* -yhteydestä hevosen kliiniseen tautiin on vaihtelevaa tietoa, sillä kokeellisen infektion ei ole havaittu aiheuttavan hevosille minkäänlaisia oireita, mutta kirjallisuudessa on kuitenkin kuvauksia tautitapauksista (kirjassa Divers 2014). Koska borrelioosi voi olla ihmisillä haasteellinen diagnosoitava ja hyvinkin vakava sairaus (kirjassa Oksi ym. 2010), aihepiiri ymmärrettävästi kiinnostaa myös lemminkinomistajia ja eläinten parissa työskenteleviä ihmisiä.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää *Borrelia burgdorferi*- ja *Anaplasma phagocytophilum* -vasta-aineiden yleisyyttä suomalaisilla hevosilla, saada arvio seroprevalensseista eri alueilla sekä tutkia erilaisten riskitekijöiden, kuten hevosen iän ja käyttötarkoituksen yhteyttä vasta-ainepositiivisuuteen.

Hypoteesina oli, että hevosten verinäytteissä havaitaan vasta-aineita molempia bakteereja kohtaan. Vasta-ainepositiivisten hevosten osuuden kuitenkin odotettiin olevan alhaisempi kuin esimerkiksi Ruotsissa (Egenvall ym. 2001) ja Tanskassa (Hansen ym. 2010) tehdyissä tutkimuksissa, sillä Suomen maantieteellisen sijainnin ja puutiaisen elinympäristöltä vaadittavien piirteiden vuoksi tartuntariskiä ei maan pohjoisosissa vielä ole. Seroprevalenssien arveltiin olevan korkeimpia Ahvenanmaalla, Etelä-Suomessa ja rannikkoalueilla. Iän, alkuperämaan (syntynyt muualla kuin Suomessa) sekä puutiaisille altistavien tekijöiden (laiduntaminen, maastossa liikkuminen) oletettiin olevan riskitekijöitä molempien bakteeritartuntojen kannalta. Vastaavissa aiemmissä tutkimuksissa on saatu vaihtelevia tuloksia riskitekijöiden merkityksestä, mutta esimerkiksi Ruotsissa hevosen rodun, alueen, näytteenottoajankohdan ja seropositiivisuuden toista tutkittua patogeeniä kohtaan havaittiin olevan merkitseviä tekijöitä *Borrelia*- tai *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisuuden suhteen (Egenvall ym. 2001).

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

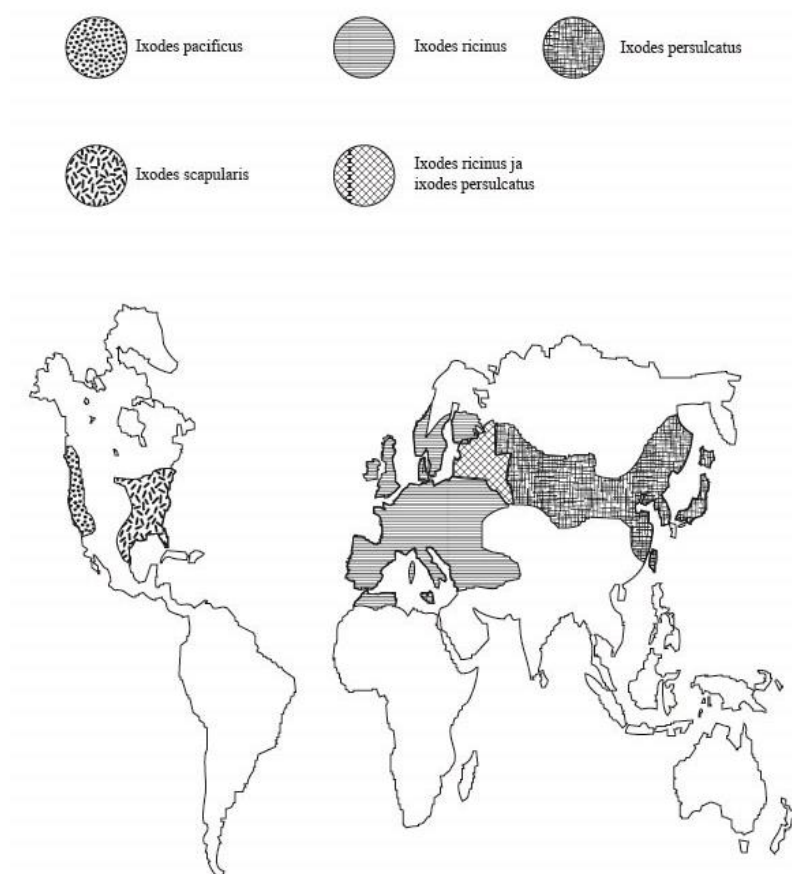
2.1 Vektori

Borrelia burgdorferi- ja *Anaplasma phagocytophilum* -bakteerien vektorina toimivat hämähäkkieläimin kuuluvat kovakuoriset *Ixodes*-suvun puutiaiset. Sukuun kuuluu 243 puutiaislajia. Suomessa ja muualla Euroopassa pääasiallisesti esiintyvä laji on *Ixodes ricinus*. Suomessa on paikoin tavattu myös *I. persulcatus*-lajia, joka tunnetaan myös taigapunkkina (kirjassa Lahdenne ym. 2011).

2.1.1 Puutiaisen levinneisyys ja elinalueet

Puutiaisen suuntaa-antava levinneisyysalue on esitetty kuvassa (kuva 1). Kasvukauden ja lumisen ajan pituus sekä isäntäeläinten määrä alueella vaikuttavat puutiaisen yleisyyteen. Puutiainen viihtyy varjoisissa lehdoissa ja metsiköissä ja riittävä ilmankosteus on sille elintärkeää. Suomessa puutiaisia on eniten saaristossa, rannikolla ja järviolueilla (kirjassa Lahdenne ym. 2011, katsauksessa Piesman ja Gern 2004). *Borrelia*- ja *Anaplasma*-lajien levinneisyysalue Suomessa on tiettävästi sama kuin puutiaisen (kirjassa Lahdenne ym. 2011).

Puutiaisten levinneisyysalueen odotetaan laajenevan tulevaisuudessa entisestään ilmaston lämpenemisen vaikutuksesta. Vuosisadan loppuun mennessä puutiaisen levinneisyysalue saattaa kattaa koko Suomen, Ruotsin ja Norjan vuoristoalueita lukuun ottamatta. Puutiaisen laajenevan elinalueen myötä myös riski sairastua puutiaisvälitteiseen tautiin lisääntyy (Jaenson ym. 2011).

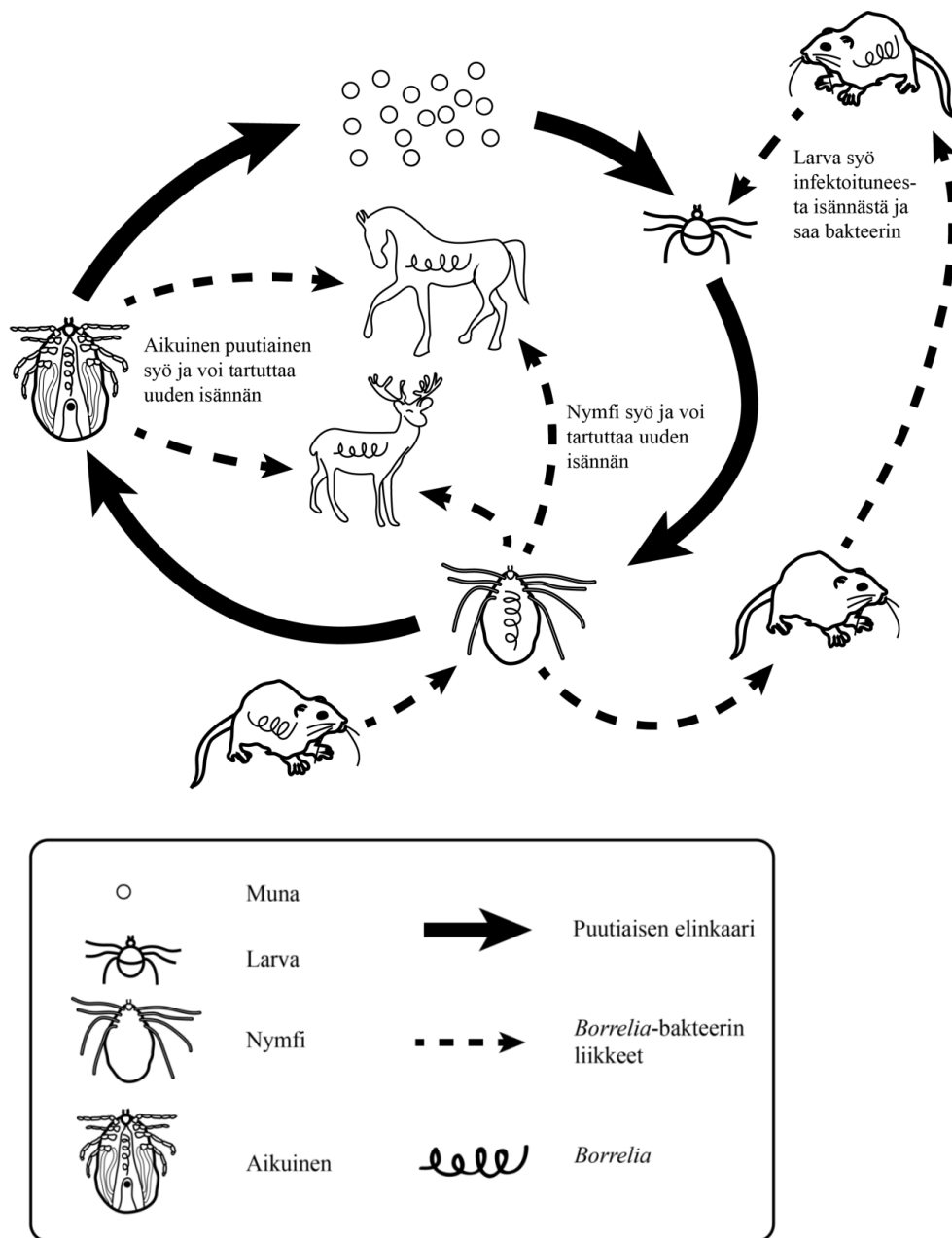


Kuva 1. Puutiaisen levinneisyysalue. Kuva on mukailtu lähteestä Stanek ym. 2012.

2.1.2 Puutiaisen elinkierto

Puutiaisella on kolme elämänvaihetta: larva, nymfi ja aikuinen. Otollisessa ilmastossa koko kehityskulku voi tapahtua yhden kesän aikana, mutta Suomessa puutiainen talvehtii kehitysvaiheiden välissä ja elää noin kolme vuotta. Puutiainen tarvitsee veriaterian kussakin kehitysvaiheessa. Lopulta aikuinen naaras munii tyypillisesti lähelle sitä paikkaa, johon on isäntäeläimestä pudottautunut. Puutiaisia onkin paljon erityisesti eläinten kulkureittien lähellä (katsauksessa Radolf ym. 2012, kirjassa Lahdenne ym. 2011).

Puutiainen kiinnittyy isäntäeläimeen erityisellä imukärsällä. Kiinnittyttyään puutiainen imee verta ja palauttaa ruokailunsa aikana punasoluja ja nestettä takaisin isäntään. Aikuinen naaras imee verta noin 0,5 ml ja palauttaa kaksi kolmasosaa nesteestä takaisin. Naaraan paino voi satakertaistua ruokailun aikana. Puutiainen tuottaa veren hyytymistä ja tulehdusta estäviä aineita, jotka mahdollistavat imemisen ohuen kärsän kautta sekä pitkäaikaisen kiinnittymisen. Aikuinen naaras saattaa olla kiinnittyneenä isäntään jopa viikon (kirjassa Lahdenne ym. 2011).



Kuva 2. Puutiaisen elinkierto. Naaraan munimista munista kuoriutuu pieniä larvoja, jotka hankkivat ensimmäisen veriateriansa ja talvehtivat sen jälkeen. Larva voi saada *Borrelia*-bakteerin jos isäntäeläin on infektoitunut. Larva kehittyy nymfiksi, joka tarvitsee uuden veriaterian. Tartuntaa kantava nymfi voi tartuttaa uuden isännän. Nymfistä kehittyy aikuinen, joka ruokailee kolmannen kerran ja lisääntyy. Kuva on mukailtu lähteestä Divers 2014.

2.1.3 Puutiaisen isäntäeläimet

Ixodes-puutiaiset kelpuuttavat tiettävästi isännäkseen yli 300 erilaista eläinlajia (katsauksessa Piesman ja Gern 2004). *I. ricinus* ruokailee ainakin peuroista, jysijöistä, linnuista, ihmisestä ja kotieläimistä. Kaikki puutiaisen suosimat isännät eivät kuitenkaan sovellu *Borrelia*-bakteerin isänniksi (katsauksessa Radolf ym. 2012). Alueilla, joissa puutiaiset ruokailevat pääasiallisesti *Borrelia*-bakteerille sopimattomista isännistä, puutiaisten infektiosta on luonnollisesti alhaisempi kuin alueilla, joissa isäntäeläiminä toimivat ensisijaisesti *Borrelia*-bakteerin suosimat lajit (kirjassa Lahdenne ym. 2011). Isossa-Britanniassa on havaittu, että *Borrelia*-bakteerille sopimaton isäntäeläin (lammas) voi kuitenkin toimia välikappaleena, sillä sen iholla lähellä toisiaan ruokailevat punkit voivat poikkeuksellisesti tartuttaa toisensa (cofeeding-mekanismi) (katsauksessa Piesman ja Gern 2004).

2.1.4 Puutiaisen kantamat taudinaiheuttajat

Puutiaisen tiedetään levittävän Suomessa borrelioosia (Lymen tauti), puutiaisaivokuumetta (Kumlingen tauti), anaplasmoosia, babesioosia ja harvoin myös tularemiaa eli jänisruttoa (kirjassa Lahdenne ym. 2011). Puutiaisen saa patogeenejä elimistöonsä imiessään verta infektoituneesta eläimestä. Sekä *Borrelia burgdorferi* että *Anaplasma phagocytophilum* siirtyvät transstadiaalisesti, jolloin tartuntaa kantavasta larvasta kehittyy tartuntaa kantava nymfi ja nymfistä vastaavasti aikuinen. Sen sijaan tartuntaa kantavan puutiaisen jälkeläisiin bakteerit eivät siirry, joten larvan puremasta ei voi saada borrelioosia tai anaplasmoosia. Täysin harmiton larva ei kuitenkaan ole, sillä se voi levittää puutiaisaivokuumevirusta, joka siirtyy transovariaalisesti infektoituneen puutiaisen jälkeläisiin (kirjassa Vapalahti ja Vaheri 2010). Muihin kuin *Ixodes*-sukuun kuuluvat kovakuoriset punkit eivät voi levittää borrelioosia (katsauksessa Radolf ym. 2012).

Borrelia-bakteerin yleisyys puutiaisissa vaihtelee alueittain. Tartuntaa kantavien puutiaisten osuus Turun ja Turun saariston alueilla sekä Etelä- ja Itä-Suomessa on ollut 5 % (Junttila ym. 1994, Mäkinen ym. 2003) ja Helsingin ulkoilualueilla 32 % (Junttila ym. 1999). Yleisin laji oli *B. afzelii*, jota kantoi noin puolet tutkituista puutiaisista (Junttila 1994, Mäkinen 2003). Ahvenanmaalla *Borrelia*-bakteerin kantajiksi todettiin 28 % tutkituista aikuisista puutiaisista (Wilhelmsson ym. 2013). *B. afzelii* on havaittu useissa tutkimuksissa yleisimmäksi ja *B. garinii* toiseksi yleisimmäksi lajiksi Suomessa, Ruotsissa

ja muualla Euroopassa (Junttila ym. 1994, Mäkinen ym. 2003, Rauter ja Hartung 2005, Wilhelmsson ym. 2013).

Mäkisen ym. (2003) Suomessa tutkimat puutiaiset eivät kantaneet lainkaan *A. phagocytophilum*-bakteeria. Eestin Vormsin saarelta kerätyissä puutiaisissa Anaplasma-tartuntaa kantavien puutiaisten osuus oli 2 % (Mäkinen ym. 2003) ja Keski-Ruotsin ja Ruotsin rannikon alueella 1,3–15,0 % (Severinsson ym. 2010, Wallménius ym. 2012).

2.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borrelia burgdorferi sensu lato (merkitsee ”laajassa mielessä” ja kattaa kaikki lajit, jatkossa lyhennetty sl) on spirokeettoihin kuuluva korkkiruuvimainen bakteeri. Bakteeri on gramnegatiivinen ja liikkuva, ja sen pituus on noin 10–30 nm ja paksuus 0,5 nm (Kirjassa Oksi ym. 2010). Bakteerin aiheuttama Lymen tauti eli borrelioosi kuvattiin ensimmäistä kertaa Connecticutissa, Yhdysvalloissa 1970-luvulla, kun alueella havaittiin poikkeuksellinen ryvästymä moniniveltulehduksesta kärsiviä lapsia (katsauksessa Radolf ym. 2012). Spirokeetta löydettiin puutiaisesta vuonna 1981 (Burgdorfer ym. 1982). *Borrelia*-sukuun kuuluu borrelioosia aiheuttavan *Borrelia burgdorferi* sensu laton lisäksi toisintokuumetta aiheuttavia borrelioita sekä matelijoiden borrelioita (Sillanpää 2014).

2.2.1 Lajit

Borrelia burgdorferi sensu lato kattaa ainakin toistakymmentä lajia. Euroopassa tunnettuja patogeeneja ovat *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto* (”kapeassa mielessä”), *B. spielmanii* sekä *B. bavariensis* (katsauksessa Stanek ym. 2012). Kaksi ensin mainittua ovat yleisimpiä. Aasiassa on vallalla *B. garinii* ja Yhdysvalloissa ainoa patogeeninen laji on *B. burgdorferi* ss (sensu stricto, ”kapeassa mielessä”) (katsauksessa Radolf ym. 2012, katsauksessa Stanek ym. 2012). Muita patogeenisiksi tiedettyjä lajeja ovat *B. valaisiana*, *N. lusitaniae* ja *B. bissettii* (katsauksessa Stanek ym. 2012). Lisäksi tunnetaan lajeja, jotka eivät joko ole patogeenisia tai joiden patogeenisyyttä ei tunneta sekä lajeja, joista on niiden löytämisen jälkeen tehty vain hyvin vähän tutkimusta tai jotka ovat edelleen sijoittamatta taksonomisesti. Osaa niistä kantaa puutiaislaji, jota ei ole ainakaan toistaiseksi todettu Lymen taudin vektoriksi (Sillanpää 2014).

Borrelia-bakteerin eri lajit on yhdistetty ihmisillä erilaisiin oirekuviin. *B. garinii* on neurotrooppinen, eli se hakeutuu hermokudokseen ja aiheuttaa erityisesti neuroborrelioosia.

B. afzelii aiheuttaa tyypillisesti iho-oireita ja *B. burgdorferi* ss erityisesti niveloireita (kirjassa Oksi ym. 2010, katsauksessa Stanek ym. 2012). Yhdysvalloissa Lymen artriitti (LA) onkin yleisimpiä borrelioosin taudinkuvia ja Euroopassa borrelioosiin liittyvät niveltulehdukset ovat harvinaisempia (katsauksessa Stanek ym. 2012).

2.2.2 *Borrelia*-bakteerin reservuaarit luonnossa

Reservuaarieläimet toimivat patogeenin varastona luonnossa. Ne kantavat bakteeria, mutta eivät sairastu kliiniseen tautiin, sillä varastoisännän sairastuminen heikentäisi bakteerin selviytymismahdollisuuksia olennaisesti. Euroopassa jyrsijät, kuten hiiret ja oravat, ovat *B. afzelii*- ja muuttolinnut *B. garinii*-lajin tärkeimpiä varastoja (katsauksessa Radolf ym. 2012). Peurat, hirvet ja kotieläimet ylläpitävät puutiaiskantaa, mutta eivät ole *Borrelia*-lajeille sopivia isäntäeläimiä eivätkä siten ilmeisesti siirrä tartuntaa ruokaileviin puutiaisiin (katsauksessa Piesman ja Gern 2004, Katsauksessa Stanek ym. 2012).

Myös *Borrelia*-lajien isänniksi soveltuvien eläinten välillä on eroja. Esimerkiksi metsähiiren (*Apodemus flavicollis*) tiedetään infektoituvan pysyvästi, mutta pystyvän pitämään bakteerimäärän elimistössään alhaisena. Metsähiirestä *Borrelia* siirtyy helposti uuteen puutiaiseen. Metsämyyrä (*Myodes glareolus*) taas kehittää puutiaista kohtaan immuunivasteen, joka estää puutiaista ahmimasta itseään täyteen (engorge) ja siten etenemästä seuraavaan kehitysvaiheeseen. Bakteerin määrä metsämyyrässä saattaa olla suuri, mutta bakteeri siirtyy huonosti puutiaiseen (katsauksessa Piesman ja Gern 2004).

2.2.3 Tartunta

Borrelia-bakteeri tarttuu puutiaisen puremasta. Kun puutiainen puree isäntäeläintä, bakteeri siirtyy puutiaisen suolesta sylkirauhasiin ja syljen mukana isännän ihoon. Ihosta bakteeri alkaa levitä joko kudoksia pitkin tai veriteitse (katsauksessa Stanek ym 2012). Useat puutiaisen syljen sisältämät aineet edesauttavat bakteerin selviämistä uudessa isäntäeläimessä (katsauksessa Radolf ym 2012). Hiirillä tehdyissä tutkimuksissa on havaittu, että luonnollisesti puutiaisen puremasta infektoituneilla hiirillä on veressään enemmän bakteeria kuin veriteitse infektoituilla hiirillä (Pusterla ym. 1999). Puremasta tartunnan saanut hiiri myös tartuttaa useampia siitä ruokailevia puutiaisia kuin keinotekoisesti infektoitu hiiri. Lisäksi tiedetään, että puutiaisen syljen sisältämät aineet voivat vaikuttaa isännän immuunivasteeseen (Pusterla ym. 1999). On arvioitu, että

infektoituneen puutiaisen pureman jälkeen tartunnan todennäköisyys olisi ihmisellä noin 10–20 % (kirjassa Oksi ym. 2010).

Puutiaisen on oltava kiinnittyneenä riittävän pitkään, jotta *Borrelia* ehtii siirtyä uuteen isäntäeläimeen. Tarvittava aika riippuu puutiaisen kehitysvaiheesta ja bakteerilajista. Bakteeri siirtyy isäntään sitä todennäköisemmin, mitä pidempään puutiaisen on kiinnittyneenä ja siirtymähuippu on havaittu 48–72 tuntia kiinnittymisestä (Crippa ym. 2002). Yhdysvalloissa *B. burgdorferi* ss:n siirtymisen *I. scapularis*- ja *I. pacificus*-puutiaisista on todettu vaativan ainakin 36 tuntia (katsauksessa Stanek ym. 2012). Toisaalta on myös viitteitä siitä, että ainakin *I. scapularis*-nymfit siirtäisivät spirokeettoja merkittävästi nopeammin kuin aikuiset, alle 24 tunnissa (Hodzic ym. 2002). Euroopassa *B. afzelii*-lajin on havaittu siirtyneen *I. ricinus*-puutiaisesta jopa alle 24 tunnissa, kun samassa tutkimuksessa *B. burgdorferi* ss ei kertaakaan siirtynyt isäntään alle 48 tunnin kuluessa (Crippa ym. 2002).

Borrelia-bakteeria on eristetty virtsasta sekä naudalla että hevosella (Burgess 1988, Manion ym. 1998). Kirjoittajat arvioivat, että bakteerin erittäminen virtsassa voisi aiheuttaa tartuntariskin astutuksessa ja mahdollisesti olla zoonoosiriski ihmisille (Manion ym. 1998). Naudoilla on kuvattu myös tartunta emästä sikiöön (Burgess 1988). Ainakin hiirillä tartunta on helppo aiheuttaa myös siirtämällä hiiren spirokeettabakteeria ilman välikkappaleena toimivaa puutiaista (Liang ym. 2000a).

2.2.4 *Borrelia*-bakteerin genetiikkaa

B. burgdorferi-bakteerin genomi on poikkeuksellisesti jakautunut lineaariseen kromosomiin ja useisiin plasmideihin (kirjassa Oksi ym. 2010). Kromosomissa sijaitsevat ns. housekeeping-geenit ja kromosomin rakenne on melko samanlainen koko suvussa. Plasmideja on enemmän kuin millään muulla bakteerilajilla, ja niiden geenisisällössä on merkittävästi enemmän vaihtelua kuin kromosomissa. Patogeenisyyteen liittyvät geenit, kuten ulkokalvon proteiineja koodaavat geenit, sijaitsevat plasmideissa (katsauksessa Radolf ym. 2012). Lisäksi lineaarisissa plasmideissa on telomeerit, mikä on bakteereilla erittäin harvinaista (Sillanpää 2014). *Borrelia*-bakteereilla ei ole aineenvaihduntaan vaadittavia geenejä, joten se on aminohappojen, nukleotidien ja rasvahappojen suhteen täysin riippuvainen isännästänsä. Genomi ei myöskään koodaa toksineja, joten infekioon liittyvän kudostuhon oletetaan aiheutuvan isännän elimistön reaktioista (katsauksessa Radolf ym. 2012).

2.2.5 *Borrelia*-bakteerin väistömekanismit ja patogeneesi

Ulkokalvon proteiinit (outer surface proteins, Osp) ovat yksi *Borrelia*-bakteerin väistömekanismeista. Niitä on useita erilaisia (OspA–OspF). Bakteeri pystyy säätelemään ulkokalvoproteiinien ekspressiota tarpeen mukaan (katsauksessa Radolf ym. 2012). Bakteerilla ei ole lipopolysakkarideja (LPS), joten ulkokalvoproteiinit ovat luultavasti myös osaltaan syynä infektiin liittyvään tulehdusreaktioon (Katsauksessa Singh ja Girschick 2004).

OspA-proteiinia ekspressoidaan levossa olevissa eli syömättömissä puutiaisissa sekä *in vitro*. OspA toimii tavallaan bakteerin ankkurina puutiaisen suolistossa ja estää bakteeria joutumasta poistoon ruoansulatusjätteen mukana (katsauksessa Singh ja Girschick 2004, katsauksessa Radolf ym. 2012). Puutiaisen ruokaillessa bakteeri alkaa alasajaa OspA:n ekspressiota, mikä mahdollistaa bakteerin irrottautumisen suolistosta ja etenemisen sylkirauhasiin. OspA:n roolia isäntään siirtymisen jälkeen ei tunneta, mutta sen tiedetään olevan hyvin immunogeeninen ja infektiolta suojaavia OspA-vasta-aineita on osoitettu hiirillä ja koirilla (Wagner ym. 2012, Wagner ym. 2013). Suomessa on olemassa myyntiluvallinen koirien borreliosisirokote, joka perustuu vasta-ainetuotantoon OspA:ta kohtaan (Lehmann 2013).

OspC:llä on rooli bakteerin siirtyessä puutiaisesta isäntään. Useimmat bakteerit eivät ekspressoisi OspC:tä syömättömässä puutiaisesa, mutta punkin ruokailu indusoi sen synteesiä. Isäntäeläimeen pääsemisen jälkeen OspC:n synteesi loppuu, mutta sitä on edelleen bakteerin pinnalla. Taudin varhaisvaiheessa havaitaan usein OspC-vasta-aineita. OspC-vasta-aineiden on todettu estävän bakteerin pääsyn puutiaisen suolistosta sylkirauhasiin (Katsauksessa Singh ja Girschick 2004). *Borrelia* sitoutuu OspC:n avulla puutiaisen syljen sisältämään Salp15-proteiiniin. Uudessa isäntäeläimessä OspC-Salp15 -kompleksi suojaa bakteeria komplementti- ja vasta-ainevälitteiseltä tappamiselta (Schuijt ym. 2008). Kokeellisesti on havaittu, että Salp15-proteiinin puuttuminen heikentää selvästi *Borrelia*-bakteerin kykyä infektoida hiiriä (Ramamoorthi ym. 2005).

OspE sekä CRASP-proteiinit (complement regulator-acquiring surface proteins) sitovat komplementin säätelytekijää tekijä H:ta ja sen kaltaisia proteiineja (Alitalo ym. 2001, Hellwage ym 2001). OspE-ekspressio bakteerissa käynnistyy kun puutiaisen syö (Hefty ym. 2002). Komplementti on tärkeä tekijä synnyntäisessä immunitetissa. Normaalisti komplementtiaktivaatio johtaa membraaneja tuhoavan kompleksin (MAC)

muodostumiseen ja bakteerin tuhoamiseen. *Borrelia* pystyy kuitenkin hyödyntämään isännän komplementin säätelyproteiineja, puutiaisen tuottamia proteiineja sekä omia komplementtiin vaikuttavia tekijöitään välttääkseen tapetuksi tulemisen (de Taeye 2013). Esimerkiksi tekijä H:n sitominen bakteerin pinnalle estää elimistöä tunnistamasta bakteeria hyökkääjäksi ja suojaa siten bakteeria tuhotuksia tulemiselta (Alitalo ym. 2001). *Borrelia*-lajien herkkyys komplementtivalitteiselle tappamiselle vaihtelee: *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii*, *B. bavariensis* ja *B. spielmanii* ovat ihmisellä ainakin osittain seerumiresistenttejä, *B. garinii* ja *B. lusitaniae* taas herkkiä (Kurtenbach ym. 1998, katsauksessa de Taeye ym. 2013).

Antigeeninen variaatio on mekanismi, joka auttaa patogeeneja välttämään tunnistetuksi tulemista. Antigeenisen variaation avulla organismi tuottaa erilaisia pintarakenteita muuntelemalla geneettistä materiaaliaan (Zhang ym. 1997). *Borrelia*-bakteerilta on löydetty plasmidissa sijaitseva variable major protein-like sequence, expressed, joka koodaa VlsE-pintaproteiinia ja mahdollistaa runsaan erilaisten varianttien tuotannon ja siten muuttaa bakteerin antigeenisyyttä ja estää isännän immuunijärjestelmää tunnistamasta bakteeria (Zhang ym. 1997, Sillanpää 2014).

Borrelia on liikkuva, mikä mahdollistaa fagosyyteiltä pakenemisen (katsauksessa Radolf ym. 2012). Bakteeri pystyy myös hyödyntämään isännän tuottamaa plasminogeeniä. Plasmiiniksi muunneettuna se hajottaa soluväliainetta ja saattaa siten helpottaa patogeenin leviämistä isännässä (Coleman ym. 1997, Brissette ym. 2009). *Borrelia* ei tietävästi tarvitse lainkaan rautaa. Välinpitämättömyys bakteereille yleisesti tärkeän ravinteen suhteen edistää bakteerin selviämistä, sillä elimistö pyrkii heikentämään patogeenien olosuhteita poistamalla tarvittavia ravinteita niiden ympäristöstä (Troxell ja Yang 2013). Lisäksi *Borrelia*-bakteerin tiedetään kykenevän muuttamaan muotoaan vasteena ympäristötekijöille. Viimeisimpänä *Borrelia*-bakteerin on havaittu muodostavan ihmisen seerumin indusoimana pieniä round bodies -kappaleita, jotka ovat metabolisesti vähemmän aktiivisia kuin spirokeettamuodossa olevat bakteerit (Meriläinen ym. 2015).

2.2.6 Seroprevalenssi eri maissa ja borreliosisin yleisyys Suomessa

Tutkimuksissa *Borrelia*-vasta-aineiden yleisyydestä hevosilla on saatu vaihtelevia tuloksia. Ruotsissa seroprevalenssin on todettu olevan 16,8 % (Egenvall ym. 2001), Tanskassa 29,0 % (Hansen ym. 2010), Isossa-Britanniassa 3–35 % (Carter ym. 1994), Ranskassa 33 % (Maurizi ym. 2010), Saksassa 16,1 % (Käsbohrer ym. 1990), Italiassa 7,0 % (Laus ym.

2013) ja 24,3 % (Ebani ym. 2012), Puolassa 25,6 % (Stefanciková ym. 2008a), Slovakiassa 26,5 % (Stefanciková ym. 2008b), Turkissa 6,33 % (Bhide ym. 2008), Romaniassa 11,92 % (Kiss ym. 2011), Yhdysvaltojen luoteisrannikolla 14,8 % (Metcalf ym. 2008) ja pohjoisessa keskilännessä 58,7 % ja (Durrani ym. 2010, Burgess ym. 1988), Brasiliassa 9,68 % (Montandon ym. 2014) ja Japanissa 97,7 % (Ybañez ym. 2012). Suomessa tutkituista hevosten verinäytteissä vasta-aineita on todettu vuosittain keskimäärin 13%:ssa (Zoonoosikeskus 2015). Tarkempaa tietoa Suomessa tutkittujen näytteiden määrästä tai tutkimisen syystä (kartoitus, epäily) ei kuitenkaan ollut saatavilla. Suomalaisilla koirilla seroprevalenssin on havaittu olevan 2,9 % (Pérez Vera ym. 2014).

Ihmisillä seroprevalenssiksi on todettu Ahvenanmaalla 19,7 % (Carlsson ym. 1998). Manner-Suomesta ei ole saatavilla vastaavaa tietoa. Määrällisesti eniten borreliosis tapauksia raportoidaan Suomessa Ahvenanmaan sekä Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirien alueella (Terveyden- ja hyvinvoinnin laitos 2015).

2.2.7 Oireet hevosella

Borreliatartunnan ja kliinisten oireiden yhteyttä ei ole kyetty osoittamaan hevosilla luotettavasti (kirjassa Divers 2014, SVA 2015a). Kokeellisesti infektoiduilla poneilla on havaittu vasta-aineita, mutta ei mainittavia oireita (Chang ym. 2000), ja terveitä seropositiivisia hevosia on paljon (kirjassa Divers 2014). Toisaalta kirjallisuudessa on kuvattu useita tapauksia, joissa hevosella on diagnosoitu borrelioosi. Seuraavien oireiden on epäilty liittyvän borrelioosiin hevosilla: nivelten täyttyminen (Bosler ym. 1988, Browning ym. 1993, Hahn ym. 1996), anoreksia (Bosler ym. 1988), jäykkyys (Browning ym. 1993, James ym. 2010), ontuminen (Burgess 1986, Browning ym. 1993, Imai ym. 2011), lihaskivut (Maloney ja Lindenmayer 1992, Imai ym. 2011), nivelkivut (Bosler ym. 1988), hyperestasia (Hahn ym. 1996) ja letargia (Hahn ym. 1996, James ym. 2010). Borrelioosiin liitettyjä diagnooseja puolestaan ovat artriitti (Imai ym. 2011), meningiitti (Hahn ym. 1996), kaviokuume (Burgess 1988), enkefaliitti (Burgess ja Mattison 1987), meningoradikuloneuriitti (Imai ym. 2011), lihaskivut (Maloney ja Lindenmayer 1992, Imai ym. 2011), uveiitti (Burgess ym. 1986, Hahn ym. 1996, Priest ym. 2012) ja kutaaninen pseudolymfooma (Sears ym. 2012).

Muissa kuin tapaukertomuksissa on myös epäilty borreliainfektion aiheuttavan hevosella kliinisiä oireita. Burgess (1988) raportoi, että seropositiivisilla hevosilla todetut oireet vastasivat aiemmin ihmisellä ja koiralla borrelioosiin liitettyjä oireita. Maloney ja

Lindenmayer (1992) havaitsivat tilastollisesti merkitsevän yhteyden seropositivisuuden ja lihaskipujen välillä, mutta totesivat kivun olevan epäspesifinen ja hankalasti diagnosoitava oire. Egenvall ym. (2001) totesivat tutkimuksessaan kavionivelen artriitin olevan ruotsalaisilla hevosilla ainoa oire, joka oli tilastollisesti yhteydessä borreliaseropositivisuuteen.

Kirjallisuudessa kuvatuissa tapauksissa hevoset ovat eläneet borrelioosille endeemisellä alueella ja niiden oireet ovat olleet pitkäkestoisia ja epäspesifisiä. Huomattavaa on, että suurin osa tutkimuksista on peräisin Yhdysvalloista, joten on mahdollista että bakteerilaji vaikuttaa oireiden kehittymiseen ja tyyppiin (SVA 2015a).

Vertailun vuoksi ihmisillä borrelioosista tunnetaan varhainen ja myöhäinen taudinkuva, jotka eroavat oireistoltaan (kirjassa Oksi ym. 2010). Rengasmainen rythema migrans - ihottuma (EM) puremakohdassa on tyypillisesti taudin ensimmäinen oire. Pitkittyneen infektion oireet ilmaantuvat yleensä noin 1–3 kuukauden kuluessa tartunnasta ja tyypillisiä oireita ovat lihas- ja nivelkiput sekä neurologiset oireet (kirjassa Oksi ym. 2010). Suomalaisista potilaista noin 50 % saa EM:n, 10 % myöhäisvaiheen iho-oireita, 20 % niveltulehduksen, 60 % lihas- ja nivelkipuja, 60 % sairastuu neurologisiin oirein ja 10 %:lla havaitaan silmäoireita, kuten sidekalvontulehdusta. Myös sydänoireet ja maksatulehdus ovat mahdollisia (kirjassa Oksi ym. 2010). Niin sanottu Post-Lyme disease syndrome ja krooninen borrelioosi ovat puhuttaneet tiedemaailmaa. Yhdysvalloissa on kuvattu antibioottihoitoon reagoimatonta Lymen artriittia, jonka on todettu liittyvän tiettyyn HLA-genotyyppiin (Sillanpää 2014). Post-lyme disease syndromen syntyyn on arveltu vaikuttavan ainakin bakteerin laji, potilaan autoimmuunitekijät ja psykologiset seikat (kirjassa Oksi ym. 2010).

2.2.8 Serologia

Borrelia-vasta-aineita on yhdessä tutkimuksessa havaittu poneilla 5–6 viikkoa tartunnan jälkeen ja korkeimmillaan vasta-ainetaso on ollut 3–4 kuukauden kuluttua tartunnasta (Chang ym. 2000). Vasta-aineita on havaittu myös nivelnesteestä (Burgess 1988). Yhden lähteen mukaan maternaaliset vasta-aineet häviäisivät varsalta ennen kahdeksan viikon ikää (Bosler ym. 1988). Ihmisellä IgM (immunoglobuliini M) kehittyy yleensä kuukauden kuluessa ja häviää puolessa vuodessa. IgG (immunoglobuliini G) nousee 6–8 viikossa ja taso on suurimmillaan vuoden kuluttua. Vasta-ainetaso laskee tyypillisesti ½–1 vuoden

kuluessa antibiootihoidosta, mutta taso voi pysyä korkeana jopa vuosien ajan (kirjassa Oksi ym. 2010).

2.2.9 Diagnostiikka hevosilla

Koska varmuutta taudin olemassaolosta hevosilla ei ole, myös luotettavat diagnoosikriteerit puuttuvat. Hevosen altistuminen *Borrelia*-bakteerille voidaan selvittää serologialla, mutta käynnissä olevan infektion diagnosoiminen sekä borreliainfektion ja kliinisten oireiden yhteyden arvioiminen on erittäin vaikeaa (kirjassa Divers 2014). Ruotsin *Statens veterinärmedicinska anstalt* (SVA) suosittelee arvioimaan puutiaiskontaktin, mahdolliset oireet, differentiaalidiagnoosit ja serologian tai mieluiten PCR:n tuloksen ennen kuin borrelioosia diagnoosina harkitaan (SVA 2015a).

Serologisessa diagnostiikassa voidaan hyödyntää Osp-vasta-aineita sekä *Borrelia*-bakteerin VlsE-jakson koodaamaa C6-peptidiä (Zhang ym. 1997). Osp-vasta-aineiden hyödyntämisessä ajatuksena on, että OspA-vasta-aineet kertoisivat rokotuksesta, OspC-vasta-aineet varhaisesta infektiosta ja OspF-vasta-aineet kroonistuneesta infektiosta tai säilyneistä vasta-aineista (Wagner ym. 2011, kirjassa Divers 2014). Ihmisillä OspC-vasta-aineiden tiedetään olevan merkinä varhaisesta infektiosta (Wagner ym. 2013) ja niitä voidaan havaita myös koiran seerumista noin 7–11 viikosta 4–5 kuukauteen infektion jälkeen (Wagner 2012). Hevosen vasta-ainevasteen on todettu olevan tässä suhteessa hyvin samankaltainen kuin ihmisillä ja koirilla, joten OspC-vasta-aineiden läsnäolo viittaisi hevosillakin varhaiseen infektiioon (Wagner ym. 2013). C6-peptidin käytöstä on kerrottu lisää aineisto ja menetelmät -osion kohdassa 3.2.2.

PCR-menetelmää käytetään bakteeri-DNA:n havaitsemiseen näytteestä. PCR voi antaa positiivisen tuloksen seronegatiivisella eläimellä, jos verinäyte on otettu ennen serokonversiota. *B. burgdorferi* tapauksessa PCR-negatiivinen tulos ei kuitenkaan poissulje infektiota, sillä virhenegatiiviset tulokset ovat mahdollisia jos DNA on eristetty verestä (Laus ym. 2013). Käytännössä PCR sopisi kliinisen tapauksen varmistamiseen seropositiivisella hevosella tai kokeellisessa tutkimuksessa, mutta tutkimuksen diagnostinen arvo oireettomalla hevosella on kyseenalainen (Laus ym. 2013). *Borrelia*-bakteeria on havaittu PCR-menetelmällä ainakin verestä (Chang ym. 2000), ihosta puutiaisen pureman jälkeen (Chang ym. 2000), ihomuutoksesta (Sears ym. 2012), etukammionesteestä ja lasiaisesta (Priest ym. 2012) sekä aivo-selkäydinnesteestä (James ym. 2010) ja hermokudoksesta (Imai ym. 2011). Yhdessä tutkimuksessa antibiootilla

hoidettujen ponien kuoleman jälkeen otetuista kudospäyteistä ei löytynyt viitteitä *Borrelia*-bakteerista, mutta hoitamattomien verrokkieläinten kudospäytteet olivat PCR-positiivisia (Chang ym. 2005).

Borrelia-bakteerin eristäminen viljelyllä on hankalaa. Ennen PCR:n käyttöönottoa tehdyssä tutkimuksessa bakteeri on onnistuttu viljelemään hevosen verestä, mutta ei nivelnesteestä (Burgess 1988). Spiroketta on myös havaittu kudospäyteissä ainakin hermokudoksesta (Hahn ym. 1996, Imai ym. 2011).

Hoitovastetta on osaltaan pidetty borreliosisen diagnostisena kriteerinä ainakin koiralla ja hevosella. Yleisimmin hoitoon käytetyt antibiootit, kuten doksisykliini, voivat kuitenkin helpottaa hevosen lihas- tai luustoperäistä kipua, joten hoitovasteen arviointi ei sellaisenaan sovellu diagnostiseksi testiksi (kirjassa Divers 2014).

2.2.10 Hoito ja ennaltaehkäisy

Yhdysvaltalaisessa kirjallisuudessa ehdotetaan borreliosisen hoidoksi tetrasykliiniä suonensisäisesti 6,6 mg/kg kerran vuorokaudessa 7–10 päivän ajan ja sen jälkeen doksisykliiniä suonensisäisesti 10 mg/kg kaksi kertaa vuorokaudessa (Chang ym. 2005, kirjassa Divers 2014). Hoidon tarve kuitenkin lieenee kyseenalainen niin kauan kuin borreliosisen merkitys hevosten sairautena ei ole selvä.

Hevosille myyntiluvallista rokotetta ei ole olemassa. Yhdysvalloissa käytetään koirille hyväksyttyjä rokotteita myös hevosilla (kirjassa Divers 2014). Yhden tutkimuksen mukaan koirien OspA-rokote suojasi poneja kokeelliselta infektiolta, eikä rokotetuista eläimistä pystytty altistuksen jälkeen havaitsemaan borreliabakteeria vaikka rokottamattomien ihosta sitä löytyi (Chang ym. 1999). Suomessa on markkinoilla koirille hyväksytty rokote, jonka on tarkoitus estää bakteerin pääsy puutiaisen suolistosta sylkirauhasiin ja siten isäntään. Rokotteen on todettu aikaansaavan vasta-ainetuotantoa, mutta suojaavaa vasta-ainetasoa ei ole määritelty eikä rokotteen tehoa kliinisen taudin ehkäisemisessä ole osoitettu (Lehmann 2013). Käytännössä tartunnalta voi suojautua ehkäisemällä puutiaisten kiinnittymistä tai poistamalla ne pian kiinnittymisen jälkeen (kirjassa Divers 2014).

2.3 *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum on solunsisäinen bakteeri, joka infektoi fagosytäärisiä neutrofiileja ja muodostaa niihin bakteeri-inkluusioita eli moruloita (katsauksessa Rikihisa 2011). *A. phagocytophilum*-bakteerin tiedetään tarttuvan ainakin ihmisiin, märehitijöihin, hevosiin, koiriin, kissoihin, kettuihin, peuroihin, jysijöihin ja lintuihin (kirjassa Seppänen ja Vapalahti 2010). Aiemmin bakteeri tunnettiin usealla eri nimellä, ja nautoja sairastutti *Ehrlichia phagocytophila*, hevosia *Ehrlichia equi* ja ihmisiä ns. human granulocyte ehrlichiosis agent. Vuonna 2001 näiden kaikkien kuitenkin todettiin olevan saman bakteerin variantteja ja ne yhdistettiin yhden nimen alle (Dumler ym. 2001).

2.3.1 Variantit

A. phagocytophilum-bakteerista tunnetaan märehitijöiden laidunkuumetta (tick-borne fever, TBF) aiheuttava variantti, ihmisten granulocyttistä anaplasmoosia (HGA) aiheuttava variantti ja hevosten granulocyttistä anaplasmoosia (EGA) aiheuttava variantti (Kirjassa Pusterla ja Madigan 2014). Geneettisesti variantit eroavat toisistaan ainoastaan paikoin 16S rRNA -geenissä (Chen ym. 1994). Käytännössä kannoissa on kuitenkin eroavaisuuksia patogeenin ja isäntäspesifisyyden suhteen. Amerikkalaisesta hevosesta eristetyn kannan on todettu aiheuttavan naudalla vasta-ainetuotantoa, mutta ei kliinisiä oireita eikä moruloita neutrofiileihin (Pusterla ym. 2001) ja naudan TBF-variantin on todettu vaikuttavan hevoseen vastaavalla tavalla (Pusterla ym. 1998). Villeistä jysijöistä eristettyjen kantojen on todettu eroavan infektiivisyydessä hevosiin (katsauksessa Rikihisa 2011). Toisaalta ihmisestä eristetyn HGA-variantin on todettu ensin sairastuttavan hevosen tyypillisin oirein ja sitten suojaavan hevosta uudelta kokeelliselta infektiolta. Uudessa altistuksessa hevosilla havaittiin ainoastaan vasta-ainetason nousua (Barlough ym. 1995). Eroja on myös mantereiden välillä: *A. phagocytophilum* aiheuttaa Euroopassa yleisesti laidunkuumetta märehitijöillä, mutta Yhdysvalloissa se ei sairastuta kotieläimistä muita kuin laaman (Pusterla ym. 2001, kirjassa Radostis ym. 2007a).

2.3.2 Levinneisyys ja reservuaarit

Anaplasma phagocytophilum-bakteeria esiintyy ainakin Euroopassa, Yhdysvalloissa ja Aasiassa. Bakteerin reservuaareja Euroopassa ovat pienet nisäkkäät, kuten metsämyyrä ja -päästäinen (Doudier ym. 2010). Reservuaarina toimivissa jysijöissä infektio on ilmeisesti lyhykestoinen, ja jysijöillä on bakteremia vain puutiaisten ollessa aktiivisia keväästä

syksyyn (Bown ym. 2003). Suomessa *A. phagocytophilum* on löydetty metsämyyristä (Kallio ym. 2014). Muuttolinnut voivat lisäksi siirtää bakteeria maasta ja alueelta toiseen (Bjöersdorff ym. 2001).

2.3.3 Tartunta

Puutiainen on tartunnan ensisijainen välittäjä. Tauti ei tartu hevosesta toiseen, mutta infektio voidaan aiheuttaa kokeellisesti antamalla hevoselle patogeeniä sisältävää verta suonensisäisesti. (Madigan ja Gribble 1987) Lampailla tiedetään, että tartuntaa voi levittää katraassa jopa käyttämällä samaa rokotusneulaa useammalla eläimellä (kirjassa Radostis ym. 2007b) ja ihmisillä on kuvattu verensiirrosta sekä ennen syntymää tai synnytyksessä saatuja tartuntoja (katsauksessa Rikihisa 2011).

Taudin inkubaatioajan hevosilla on kokeellisesti todettu olevan 8–12 vrk tartuntaa kantavia puutiaisia käytettäessä ja 3–10 vrk infektoitunutta verta käytettäessä. Luonnollisessa infektiossa inkubaatioajan uskotaan olevan alle 14 vuorokautta (Kirjassa Pusterla ja Madigan 2014). Taudin kliininen kuva ja korkein saavutettu vasta-ainetaso ovat samat tartuntatavasta riippumatta, mutta inkubaatioaika on verta käytettäessä tilastollisesti merkittävästi lyhyempi ja hevosilla havaitaan vasta-aineita ja trombositopeniaa aikaisemmin kuin puutiaisia käytettäessä (Pusterla ym 1999).

2.3.4 *A. phagocytophilum* -bakteerin patogeneesi ja väistömekanismit

A. phagocytophilum välttelee ja hyödyntää neutrofiilejä monin tavoin. Yleensä neutrofiilit tunnistavat ja sitoutuvat bakteereissa tiettyihin kohtiin (pathogen-associated molecular patterns), mutta *Anaplasma*-bakteereilta puuttuvat tyypillisimmät tunnisteet kuten lipopolysakkaridi ja peptidoglykaani (Siska ym. 2013). *A. phagocytophilum* kykenee myös poikkeuksellisesti selviytymään neutrofilin sisällä tulematta tuhotuksi (Katsauksessa Woldehivet 2008). Neutrofiilien normaali elinikä perifeerisessä veressä on lyhyt ja yleensä neutrofiilit apotoituvat nopeasti fagosytoituaan esimerkiksi bakteerisolun, mutta *A. phagocytophilum* kykenee viivyttämään apoptoosia (Katsauksessa Woldehivet 2008). *Anaplasma*-bakteerin epäillään lisäävän omaa selviämistodennäköisyyttään myös suojaamalla puutiaista kylmältä. Bakteerin tiedetään lisäävän *I. scapularis* -puutiaisen tuottaman ”jäätymisenestoaineen” tuotantoa (Siska ym. 2013).

A phagocytophilum-bakteerin tiedetään aiheuttavan immunosuppressiota ainakin ihmisellä ja lampaalla (Lepidi ym. 2000, kirjassa Radostis ym. 2007b). Bakteri aiheuttaa merkittävää lymfositopeniaa ja trombositopeniaa. Naudalla jopa 70 % neutrofiileistä voi sisältää bakteri-inklusion, mikä saattaa heikentää solujen toimintaa. Lampaista tiedetään, että sairastuneen eläimen vasta immunogeenille, kuten tetanustoksoidille, on alentunut (kirjassa Radostits ym. 2007b). Sairastunut eläin ei myöskään tuota vasta-aineita muuta hyökkääjää kohtaan normaalisti (Katsauksessa Woldehivet 2008). TBF-varianttien sairastuttamat eläimet ovat normaalia alttiimpia sairastumaan useisiin muihin tauteihin. Lampailla on osoitettu, että laidunkuumeeseen liittyy lisääntynyt herkkyys useiden bakteerien aiheuttamille infektioille (kirjassa Radostis ym. 2007b). Herkkyys sekundaari-infektioille on osoitettu myös ihmisillä (Lepidi ym. 2000) ja hevosilla sitä epäillään (Gribble 1969). *Anaplasma phagocytophilum* -infektion tiedetään myös potentoivan louping ill -virusta samanaikaisessa infektiossa (kirjassa Radostis ym. 2007b).

Naudan ja lampaan on todettu voivan jäädä bakteerin kantajiksi jopa kahden vuoden ajaksi infektion jälkeen. Kantajilla on ajoittain bakteremia, ja akuutin bakteremian vaiheessa organismia on osoitettu myös kudismakrofageista (katsauksessa Woldehivet 2008). Kokeellisesta infektiosta parantuneilta hevosia seuraamalla on havaittu, että jo PCR-negatiivisia tuloksia antaneet eläimet ovat ajoittain PCR-positiivisia erityisesti stressaavien tilanteiden jälkeen. Löydös voi viitata siihen, että bakteri voisi säilyä elimistössä pitkään parantumisen jälkeenkin (Franzén ym. 2009, Siska ym. 2013).

2.3.5 Seroprevalenssi eri maissa

A phagocytophilum -vasta-aineiden prevalenssi hevosilla on ollut Ruotsissa 16,7 % (Egenvall ym. 2001), Tanskassa 22,3 % (Hansen ym. 2010), Ranskassa 11,3 % (Leblond ym. 2005), Keski-Italiassa 13,4 % (Laus ym. 2013) sekä Sisiliassa 9,0 % (Giudice ym. 2010), Tsekeissä jopa 73 % (Praskova ym. 2011), Tunisiassa 16,3 % (Said ym. 2014), Israelissa 0 % (Levi ym. 2006) ja Japanissa 3,4 % (Ybañez ym. 2012). Suomalaisilla hevosilla seroprevalenssia ei tiettävästi ole aiemmin tutkittu. Suomalaisilla koirilla seroprevalenssin on todettu olevan 5,3 % (Pérez Vera ym. 2014). Esimerkiksi Yhdysvalloissa ja Ruotsissa on kuvattu useita klinisiä tautitapauksia hevosilla, Suomessa yksi (SVA 2015b, Valkjärvi ym. 2010).

2.3.6 Hevosen granulosyyttisen anaplasmoosin oireet

Toisin kuin borrelioosi, granulosyyttinen anaplasmoosi on hevosilla hyvin tunnettu sairaus. Tauti voi olla akuutti tai subkliininen. Subkliinisen infektion yleisyyteen viittaa se, että suuri osa populaatiosta voi olla seropositiivisia mutta vain harvat sairastuvat kliinisin oirein (Gribble 1969, Madigan ym. 1990). Tyypillisiä oireita hevosella ovat korkea kuume, ihonalaiskudoksen ödeemi alaraajoissa ja mahdollisesti myös vatsan alla ja preputiumissa, apatia, anoreksia, haluttomuus liikkua sekä ataksia (Gribble 1969). Lisäksi hevonen saattaa olla ikteerinen ja syke ja hengitystiheys saattavat olla koholla (Siska ym. 2013). Taudin akuuttivaiheessa saatetaan havaita arytmioita (kirjassa Radostis ym. 2007a) ja systolinen sivuääni, jonka on oletettu johtuvan turbulenssista (Franzén ym. 2005). Kuumetta on tyypillisesti 40–42 astetta ja se kestää 1–2 vuorokautta (Gribble 1969). Oireiden kesto on 3–16 vuorokautta (Madigan ja Gribble 1987, Radostis 2007a). Kirjallisuudessa anaplasmoosiin on liitetty myös lannehalvaus (Hilton ym. 2008) ja akuutti makaamaan jääminen (Nolen-Walston ym. 2004).

Hevosen anaplasmoosille on tyypillistä, että oireiden voimakkuus vaihtelee hevosen iän mukaan. Voimakkaat oireet ovat tyypillisiä yli 4-vuotiaille, joilla esimerkiksi ataksia voi olla huomattavaa. Alle 4-vuotiailla oirekuva on lievempi, ja alle 1-vuotiailla ainoa oire saattaa olla lievä kuume, minkä vuoksi tautia on vaikea tunnistaa nuorella eläimellä (Madigan ja Gribble 1987, kirjassa Pusterla ja Madigan 2014).

Mahdollisia differentiaalidiagnooseja ovat virusarteriitti, hevosen näivetystauti, piroplasmaosi, enkefaliitti, primääri maksasairaus ja purpura hemorrhagica (Gribble 1969, kirjassa Pusterla ja Madigan 2014).

Kirjallisuudessa on kuvattu yksi anaplasmoosin aiheuttamaksi epäilty kuolema hevosella. Kokeellisesti infektoitu hevonen kuoli äkillisesti oireiden alkamisen jälkeen, ja patologisessa tutkimuksessa todetut muutokset viittasivat yleistyneeseen hyytymishäiriöön (DIC). Hyytymishäiriötä on aiemmin todettu HGA-potilailla (Franzén ym. 2007). Lisäksi epäsuorat kuolemat immuunisuppressiota seuraaviin opportunistisiin infektioihin ja neurologisten oireiden aiheuttamiin traumoihin ovat mahdollisia (Madigan ja Gribble 1987). Ihmisillä kuolleisuus tautiin on Yhdysvalloissa ollut harvinaista ja Euroopasta kuolemantapauksia ei ole raportoitu (Blanco ja Oteo 2002).

2.3.7 Verenkuva ja patologiset muutokset

Tyypillisiä verinäytteessä havaittavia muutoksia ovat neutrofiileihin muodostuneet inkluusiot eli morulat, leukopenia, trombositopenia sekä alentunut hematokriitti ja normosyyttinen, normokrominen anemia (Gribble 1969, Stannard ym. 1969). Bakteerin aiheuttaman neutropenian ja lymfosytopenian syitä ei tiedetä (Siska ym. 2013). Sairastuneen yksilön lymfosyyttien vasteen solunjakautumista kiihdyttävillä aineilla (mitogeenit) tiedetään olevan alentunut (katsauksessa Woldehivet 2010). Bakteeri ei vaikuta suoraan verihiutaleisiin, joten trombositopenian syynä lieenee verihiutaleiden tuhoutuminen kapillaareissa, sekvesteraatio tai alentunut tai puuttuva tuotanto (Siska ym. 2013). Hevosilla anaplasmoosin taudinkuvassa trombositopenia on usein huomattavaa ja seurauksena on petekkioita ja ekkymooseja. Muuta tyypillistä seurausta, kuten vuotoa ruumiinonteloihin, ei kuitenkaan todeta (Siska ym. 2013).

Patologisessa tutkimuksessa voidaan havaita verenvuotoja limakalvoilla, ihonalaiskudoksessa ja faskioissa sekä ödeemi raajoissa, ventraalisesti vatsan alueella ja esinahassa. Histologisesti voidaan havaita pienten verisuonien inflammaatiota erityisesti ihonalaiskudoksessa, faskioissa, raajojen hermojen ympärillä sekä munasarjoissa ja kiveksissä. Sydänoireiden arvellaan johtuvan sydänlihaskudoksen vaskuliitista (kirjassa Pusterla ja Madigan 2014).

2.3.8 Serologia

Vasta-aineet ilmaantuvat yleensä vasta oireiden alkamisen jälkeen ja säilyvät pitkään. Yhdessä tutkimuksessa vasta-aineet havaittiin 12–16 vuorokauden ja kliiniset oireet 6–9 vuorokauden kuluttua tartunnasta (Franzén ym. 2005). Toisessa ruotsalaistutkimuksessa seurattiin hevosia, joilla oli todettu kliininen anaplasmoosi ja tyypilliset muutokset verinäytteessä. Taudin akuuttivaiheessa vain 44 % hevosista oli seropositiivisia, mutta vasta-ainetaso nousi nopeasti ja oli korkeimmillaan kuukauden kuluttua tartunnasta. Kahdeksan kuukauden kuluttua vasta-ainetasot olivat laskeneet, mutta 18/24 (75 %) hevosista oli edelleen seropositiivisia ja 12–15 kuukauden kuluttua vasta-aineita havaittiin edelleen 8/18 hevosella (Artursson ym. 1999).

Kokeellisen infektion seurauksena muodostuneiden vasta-aineiden on todettu suojaavan hevosta pitkään. Yhdessä tutkimuksessa kokeellisesti infektoitu hevonen ei saanut uudessa altistuksessa oireita eikä verinäytteessä havaittu muutoksia vielä 20 kuukaudenkaan kuluttua ensimmäisestä tartunnasta (Gribble 1969). Lampailla maternaalisten vasta-

aineiden tiedetään suojaavan karitsaa tartunnalta kokeellisissa olosuhteissa, mutta ei käytännössä (kirjassa Radostis ym. 2007b). Yhden tamman jälkeläisillä tehdyn tutkimuksen mukaan maternaaliset vasta-aineet suojaavat varsaa noin kolmen kuukauden ikään asti. Eri ikäisinä tutkituista varsoista vain kolmen kuukauden iässä altistettu (vanhin) varsa sai klinisiä oireita (Gribble 1969).

2.3.9 Diagnoosi

Diagnoosi voidaan tehdä tyypillisten oireiden, Giemsa-värjätystä verisivelyssä neutrofiileissä havaittavien moruloiden ja EDTA-verestä PCR-menetelmällä havaitun bakteeri-DNA:n perusteella (kirjassa Pusterla ja Madigan 2014). Moruloita voi olla jopa 30–50 %:ssa neutrofiileistä 3–5 vuorokauden kuluttua tartunnasta. Moruloita on nähtävä enemmän kuin kolme, jotta diagnoosi on luotettava (Madigan ja Gribble 1987, Kirjassa Pusterla ja Madigan 2014). Moruloita havaitaan kuitenkin vain bakteremian aikana, joten väärän negatiivisen tuloksen riski kasvaa jos diagnoosimenetelmänä käytetään ainoastaan verisivelyä (katsauksessa Woldehivet 2010, Uehlinger ym. 2011).

PCR:lla bakteeri voidaan havaita 2–3 päivää ennen kliinisten oireiden alkua ja vielä 4–9 päivää oireiden loppumisen jälkeen, joten se voi olla hyvä diagnostinen väline taudin varhais- ja loppuvaiheissa (Franzén ym 2005, kirjassa Pusterla ja Madigan 2014).

Serologia on usein käytetty, mutta yksinään riittämätön diagnostiikkamenetelmä (Artursson ym. 1999, Franzén ym. 2005). Taudin akuutissa vaiheessa vain osa hevosista on seropositiivisia ja lisäksi yksi verinäyte ei kerro onko kyseessä käynnissä oleva vai aiempi infektio ja siitä jäänyt ns. serologinen arpi (Franzén ym. 2005, kirjassa Oksi ym. 2010). Pariseeruminäytteessä yli nelinkertainen nousu vahvistaisi tartunnan (kirjassa Pusterla ja Madigan 2014).

2.3.10 Hoito ja ennaltaehkäisy

Hoitona käytetään oksitetrasykliinia 7 mg/kg suonensisäisesti annosteltuna 24 tunnin välein 5–7 vuorokauden ajan (Madigan ja Gribble 1987, kirjassa Pusterla ja Madigan 2014). Oireiden tulisi helpottua selvästi 12 tunnin kuluessa. Neutrofiilien inkluusiokappaleet häviävät antibiootilla hoidetuilta hevosilta 48–72 tunnin kuluessa hoidon aloittamisesta. Jos oireet eivät lievene vuorokauden kuluessa hoidon aloittamisesta, on vahva syy epäillä muuta sairautta. (Madigan ja Gribble 1987). Tauti rajoittuu myös itseksensä 2–3 viikossa,

mutta laihtuminen, ödeemi ja ataksia voivat olla silloin voimakkaampia ja pitkäkestoisempia. Hoidetuilla potilailla ataksia kestää 2–3 vuorokautta ja edeema joitakin päiviä (Madigan ja Gribble 1987).

Anaplasma phagocytophilum -tartuntaa vastaan ei ole olemassa rokotetta. Endemisillä alueilla eläimiä voidaan suojata tartunnalta puutiaiskarkottein (kirjassa Radostits ym. 2007a).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Aineisto

3.1.1 Yleistä

Tutkimusta varten hankittiin verinäytteitä sekä pikkuvarsoista (syntyneet näytteenottoa edeltävänä kesänä) että yli 2-vuotiaista hevosista (jatkossa selvyiden vuoksi ”aikuiset hevoset”). Hevosien laskettiin täyttävän vuoden syntymävuottaan seuraavan tammikuun alussa. Tutkimusta varten haettiin koe-eläinlupa.

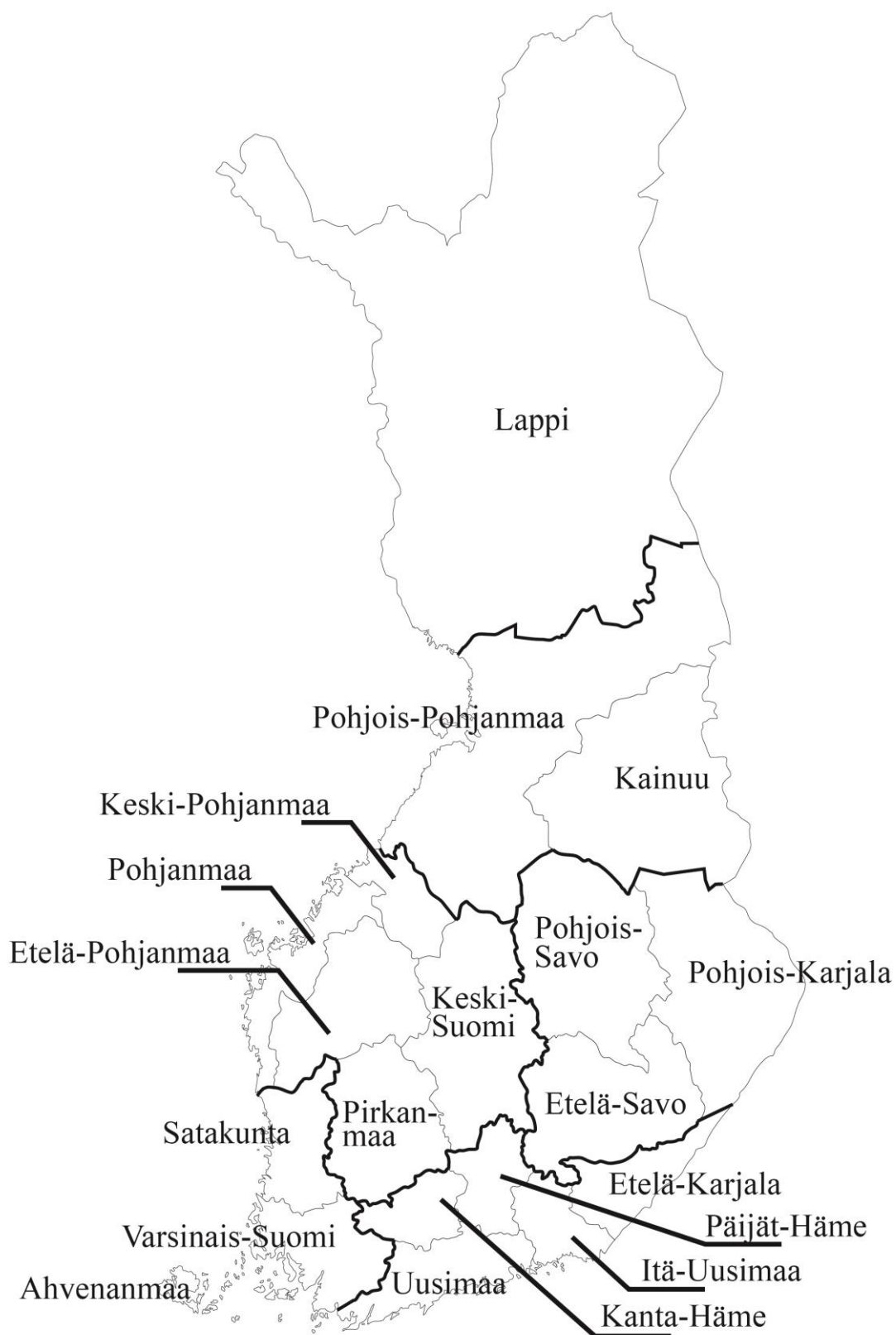
Otoskokooksi laskettiin 372 hevosta. Otoskoko laskettiin käyttämällä EpiTools-ohjelmaa (Sergeant, ESG, 2015. Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease.) ja laskuria epätäydelliselle testille (Humphry ym. 2004). Vasta-aineprevalenssiksi arviointiin 15%, populaation kooksi 75 500 (Suomen Hippos ym. 2011), testin sensitiivisyydeksi 80 % ja spesifisyydeksi 95 %. Luottamusväliksi valittiin 95 % ja virheeksi 5 %. Koska näytteitä haluttiin edustavasti sekä varsoista että aikuisista hevosista, molemmissa ryhmissä päätettiin tavoitella 300 näytettä.

Suomen Hippoksen alaiset Hevosjalostusliitot (16 kpl) tilastoivat hevosten lukumääriä omilla alueillaan (Suomen Hippos ym. 2012). Näytteiden tavoitemäärä jaettiin maakunnittain (kuva 3) niin, että kultakin alueelta hankittavien näytteiden määrä suhteutettiin alueella elävien hevosten määrään (taulukko 1). Lopulliseen näytemäärään vaikuttivat myös käytännön seikat, sillä osalta alueista näytteitä oli saatavilla tarvittua

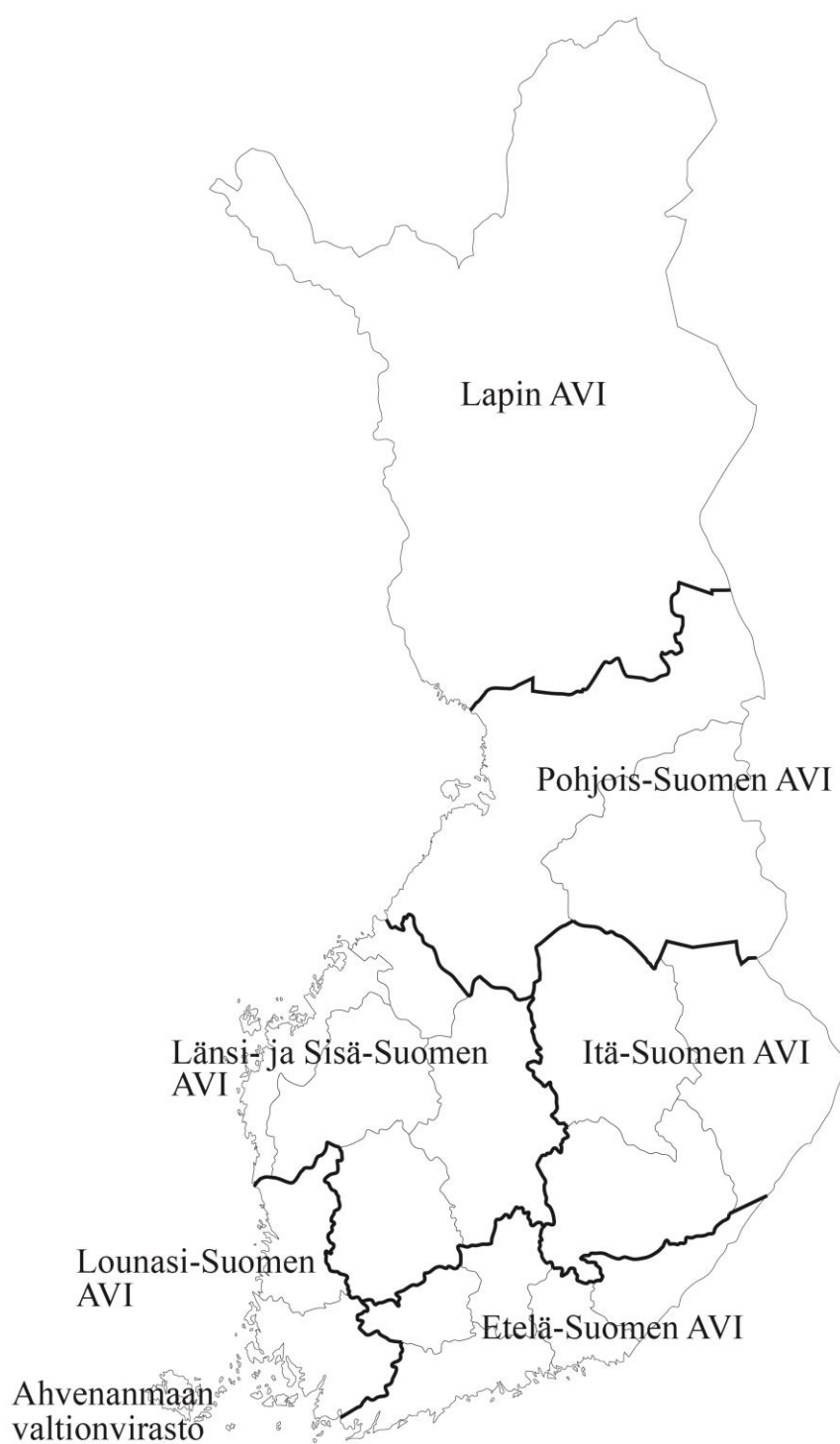
enemmän ja osalta niiden hankkiminen oli haastavaa. Aineiston käsittelyä varten näytteet jaettiin hevosten kotikuntien perusteella aluehallintovirastoittain (kuva 4) ja tilastollista analyysiä varten aluehallintovirastojen alueita yhdistettiin vielä keskenään kaikkiaan neljäksi alueeksi (kuva 5).

Taulukko 1. Hevosten ja näytteiden lukumäärät alueittain. Tieto hevosten lukumäärästä kullakin alueella perustuu Hippoksen tilastoon hevosten lukumääristä hevosjalostusliittojen alueilla (Suomen Hippos ym. 2012). Ahvenanmaalla elävät hevoset sisältyvät Lounais-Suomen lukuihin.

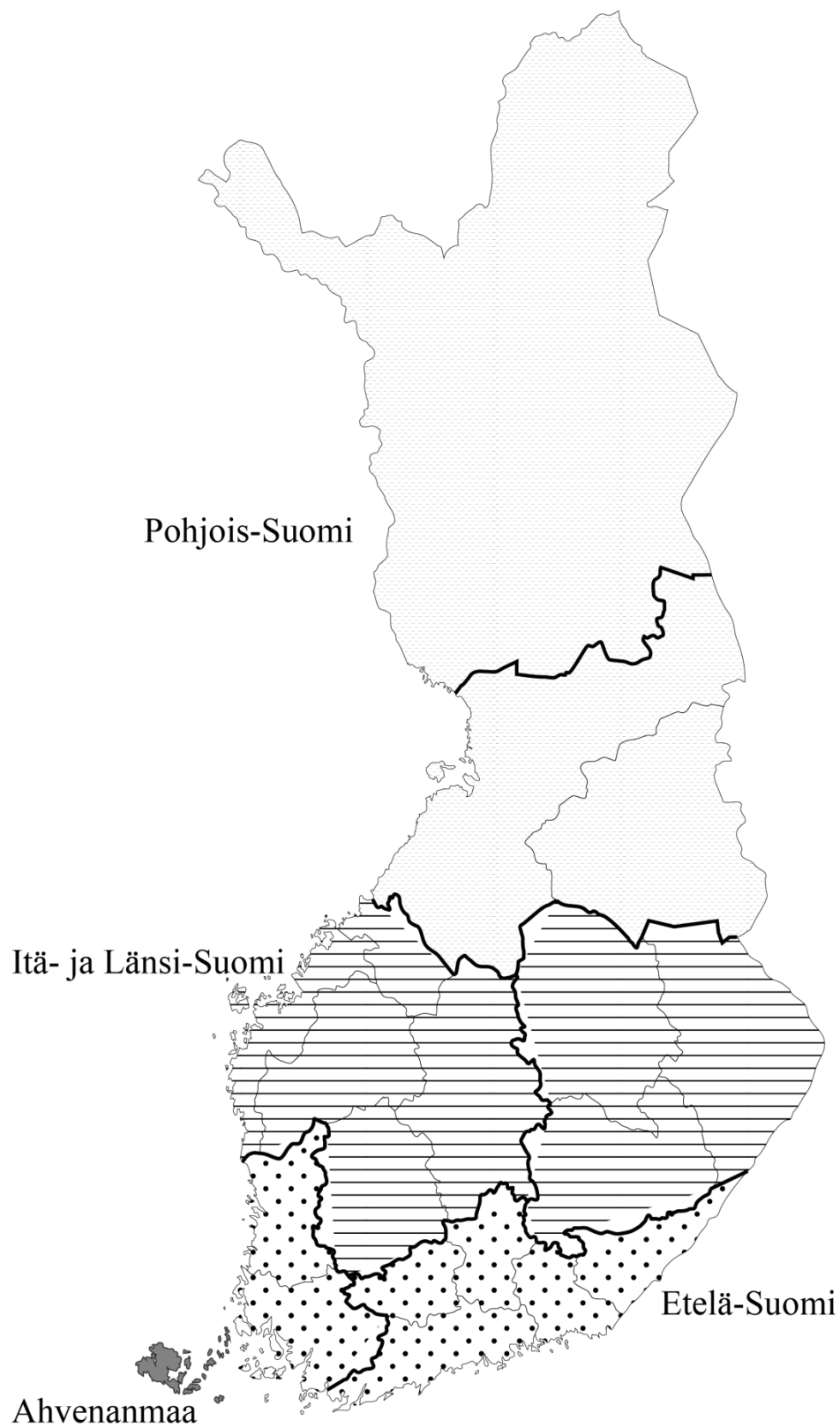
aluehallintovirasto	hevosten lukumäärä alueella		aikuiset			varsat		
	n	%	n	%	95 % luottamusväli	n	%	95 % luottamusväli
Etelä-Suomi	25733	34,8	102	32,0	27–37,2	90	32	26,8–37,6
Lounais-Suomi	10538	14,3	44	13,8	10,3–17,9	38	13,5	9,0–17,9
Itä-Suomi	11114	15,2	41	12,9	9,5–16,9	43	15,4	11,5–19,9
Länsi- ja Sisä-Suomi	17244	23,3	74	23,2	18,8–28,1	79	28,1	23,1–33,6
Pohjois-Suomi	7165	9,7	34	10,7	7,6–14,4	24	8,5	5,7–12,2
Lappi	2061	2,7	5	1,6	0,6–3,4	7	2,5	1,1–4,8
Ahvenanmaa	*		19	6	3,7–9,0	0	0	0
yhteensä	73855	100	319	100		281	100	



Kuva 3. Maakuntajako.



Kuva 4. Aluehallintovirastojen mukainen maantieteellinen jako.



Kuva 5. Tilastollisessa analyysissä noudatettu aluejako Ahvenanmaahan sekä Eteläiseen, Keskiseen (kuvassa Itä- ja Länsi-Suomi) ja Pohjoiseen Suomeen.

3.1.2 Varsojen näytteet

Varsojen verinäytteet saatiin käyttöön varsojen tunnistusnäytteitä käsittelevältä laboratoriolta (Genoscooper Laboratories, Helsinki) toukokuussa 2012. Verinäytteet oli otettu marraskuun 2011 ja helmikuun 2012 välisenä aikana. Verinäytteitä olivat keränneet hevosjalostusliittojen tunnistajat varsojen polveutumismäärityksiä varten. Jokaisesta syntyneestä varsasta otetaan verinäyte ja samalla varsat rekisteröidään Suomen Hippoksen rekisteriin (Hevosjalostusliitot 2015). Näytteitä saatiin yhteensä 281 kappaletta, ja niiden alueellinen jakautuminen on esitetty aiemmin taulukossa 1. Laboratorion kirjanpidosta selvitettiin lisäksi varsojen syntymäaika, sukupuoli ja rotu (taulukko 2).

3.1.3 Aikuisten hevosten näytteet

Aikuisten hevosten verinäytteitä kerättiin yhteensä 319 kappaletta. Näytteet kerättiin pääosin vuodenvaihteessa 2012–2013 eläinlääketieteen opiskelijoiden avulla eri puolilta Manner-Suomea. Ahvenanmaalta verinäytteitä kerättiin paikallisten eläinlääkärien avustuksella tammi-maaliskuussa 2015. Näytteiden jakautuminen alueittain on esitetty taulukossa 1.

Hevosen omistajaa tai haltijaa pyydettiin täyttämään hevosen perustietoja ja taustaa käsittelevä kysymyslomake. Kysytyt asiat olivat hevosen nimi, syntymäaika, syntymämaa, kotipaikka, rotu, hevosen käyttötarkoitus (ravuri / ratsu / ratsastuskouluhevonen / harrastehevonen / siitos) laiduntaako hevonen, liikutetaanko hevosta maastossa, onko hevosessa havaittu punkkeja, kuinka pitkään omistaja on tuntenut hevosen ja kuinka pitkään hevonen on asunut nykyisellä

Taulukko 2. Varsojen rotu- ja sukupuolijakauma.

	n	%	95 % luottamusväli
Roturyhmä			
lämminverinen ravuri	107	38,1	32,5–43,9
suomenhevonen	115	40,9	35,3–46,7
ratsu tai poni	59	21	16,5–26
Sukupuoli			
tamma	142	50,5	44,7–56,3
ori	138	49,1	43,3–54,9
puuttuu	1	0,4	

kotipaikkakunnallaan sekä hevosen terveydentila. Kysymyslomake on liitteenä (Liite I). Tietoja hevosen syntymäajasta, alkuperämaasta ja mahdollisesta tuontivuodesta täydennettiin tarvittaessa ja mahdollisuuksien mukaan Suomen Hippoksen heppa.hippos.fi-verkkopalvelusta. Osa hevosista ei mahdollisesti ollut suomalaisessa hevosrekisterissä tai oikeaa hevosta ei löytynyt esimerkiksi virheellisen nimen vuoksi, joten osan kohdalla tiedot jäivät puuttumaan. Hevosten jakautuminen roturyhmittäin, käyttötarkoituksen mukaan ja niin edelleen on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Aikuisten hevosten tiedot muuttujittain jaoteltuna. Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla.

	n	%	95 % luottamusväli
Sukupuoli			
tamma	173	54	48,7–59,6
ruuna	132	41	36,1–46,8
ori	14	4,4	2,5–7,1
Ikäryhmä			
≤5-vuotiaat	51	16	12,4–20,4
6–15 -vuotiaat	189	59	54,2–64,9
≥16-vuotiaat	77	24	19,8–29,2
puuttuu	2	0,6	
Roturyhmä			
lämminverinen ravihevonen	64	20	16,1–24,9
suomenhevonen	72	23	18,4–27,6
ratsu	180	56	51,5–62,3
puuttuu	3	0,9	
Käyttötarkoitus			
ravuri	43	14	10,2–17,8
ratsu	233	73	69,2–78,8
siitos	28	8,8	6,1–12,4
muu/puuttuu	15	4,7	
Alue			
Ahvenanmaa	19	6	3,7–9,0
Eteläinen	146	46	40,4–51,3
Keskinen	115	36	30,9–41,4
Pohjoinen	39	12	9,0–16,2
puuttuu	0	0	
Alkuperämaa			
Suomessa syntynyt	196	61	56,4–67,1
tuontihevonen	121	38	32,9–43,6
puuttuu	2	0,6	

	n	%	95 % luottamusväli
Laiduntaako			
kyllä	273	86	85,6–92,6
ei	32	10	7,4–14,3
puuttuu	14	4,4	
Maastokäyttö			
kyllä	272	85	84,7–91,8
ei	35	11	8,2–15,3
puuttuu	12	3,8	
Havaittu puutiaisia			
kyllä	37	12	10,0–18,2
ei	233	73	82,8–90,0
puuttuu	49	15	
Oireita			
kyllä	53	17	13,8–22,5
ei	244	77	77,5–86,2
puuttuu	22	6,9	

Hevosten iät olivat 2–30 vuotta (keskiarvo 11,76 vuotta, mediaani 11 vuotta).

Hevoset edustivat yhteensä 46 eri rotua. Yleisimmät yksittäiset rodut olivat suomenhevonen (72 kpl), amerikkalainen lämminverinen (45), suomalainen puoliverinen (23) ja islanninhevonen (18). Poneista eniten oli shetlanninponeja (8). Hevoset jaoteltiin roturyhmittäin Hippoksen luokittelua mukaillen. Jaottelussa ratsuhevosiin luettiin lämminveriset ratsuhevoset, islanninhevoset ja ponit sekä kylmäveriset suomenhevosta lukuun ottamatta. Tieto kunkin hevosen käyttötarkoituksesta perustuu omistajan ilmoitukseen näytteenottohetkellä. Kyselylomakkeen vaihtoehdot *ratsu*, *ratsastuskouluhevonen* ja *harrastehevonen* on tilastollisen analyysin vuoksi yhdistetty ratsu-otsakkeen alle.

Hevoset olivat lähtöisin yhteensä 21 eri maasta. Yleisimmät alkuperämaat olivat Suomi sisältäen Ahvenanmaan (196 kpl, 61,5 %), Saksa (24 kpl, 7,5 %) Ruotsi (21 kpl, 6,6 %), Eesti (21 kpl, 6,6 %) ja Alankomaat (12 kpl, 3,8 %). Kahdelta hevoselta puuttui tieto alkuperämaasta (0,6 %). Yli kolmasosa hevosista oli syntynyt ulkomailla..

Suurin osa hevosista laidunsi kesäisin. Yleisin laidunkauden kesto oli 4 kuukautta (115 kpl eli 42,1 % kaikista laiduntavista hevosista) ja tyypillisin ajankohta touko-elokuu.

Kysymyslomakkeessa tiedusteltiin myös hevosten mahdollisia oireita ja sairauksia. Oireiden tai sairauden havaitsemisen mahdollista ajankohtaa tai parantumista ei kysytty tarkemmin, vaan omistajat kirjasiivat tärkeiksi tai ajankohtaisiksi kokemansa asiat. Yleisimpiä mainittuja ongelmia olivat tuki- ja liikuntaelimestön vaivat, kuten ontuminen ja jäykkyys, joita oli 43:lla oireilevista hevosista. Yhden hevosen kerrottiin sairastaneen anaplasmoosia ja yksi oli saanut diagnoosiksi borrelioosin yli kymmenen vuotta sitten.

3.2 Menetelmät

3.2.1 Näytteiden käsittely

Varsojen näytteet olivat EDTA-kokoverta, ja ne oli pakastettu ja säilytetty -20 asteessa. Näytteet analysoitiin keväällä 2012. Aikuisista hevosista otettiin seerumi- ja EDTA-verinäytteet, joista seerumiputket talletettiin toista tutkimusta varten. Näytteet pakastettiin joko plasmana tai kokoverenä -20 asteeseen ja analysoitiin keväällä 2013.

3.2.2. Näytteiden analysointi

Tutkimuksessa käytettiin SNAP[®]4DX[®] PLUS ELISA -pikatestiä (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, Yhdysvallat). SNAP 4DX on niin sanottu in-house ELISA-testi, joka on tarkoitettu koirien vektorivälitteisten infektioiden diagnostiikkaan. Koirilla testi tunnistaa *Dirofilaria immitis* -antigeenin sekä *B.burgdorferi*-, *A. phagocytophilum*-, *A. platys*-, *Ehrlichia canis*- ja *E. ewingii* -vasta-aineet (IDEXX 2015). Hevosilla testi tunnistaa *Borrelia burgdorferi*- ja *A. phagocytophilum* -vasta-aineet (Chandrashekar ym. 2008).

SNAP-testi valittiin käyttöön sen helppokäyttöisyyden ja hyvän saatavuuden vuoksi sekä siksi, että yhdellä testillä oli mahdollista etsiä näytteistä sekä *B. burgdorferi*- että *A. phagocytophilum* -vasta-aineita. Testi suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan ja tulokset luettiin kahdeksan minuutin kohdalla (kuva 6).



Kuva 6. SNAP 4DX Plus -testi. Vasemman yläkulman täplä on kontrolli ja alalaidan vaalea täplä tarkoittaa *Borrelia*-positiivista tulosta.

Testin sensitiivisyyttä ja spesifisyyttä kuvaavia tutkimustuloksia on esitetty taulukossa 4. Koirilla tehdyt tutkimukset on otettu vertailukohdaksi, sillä testin toimivuutta ei ole tutkittu hevosilla Euroopassa. Testi on tutkimusten mukaan vaihtelevan sensitiivinen ja hyvin spesifinen. Virhenegatiiviset tulokset, joissa testi osoittaa todellisuudessa seroposiitiivisen verinäytteen negatiiviseksi, ovat siis mahdollisia ja virhepositiiviset tulokset melko epätodennäköisiä.

Taulukko 4. SNAP-testin sensitiivisyys ja spesifisyys joidenkin tutkimusten mukaan.

eläinlaji	sensitiivisyys	spesifisyys	mihin verrattu	maa	viite
<i>Borrelia burgdorferi</i> sl					
hevonen	63	100	PCR	USA	Johnson ym. 2008
hevonen	100	95	IFA, Western blot	USA	Chandrashekar ym. 2008
hevonen	93	96	PCR	USA	Wagner ym. 2013
koira	98,5	95,7		USA	Goldstein ym. 2014
koira	84,2	98,5	PCR	Saksa	Barth ym. 2014
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>					
hevonen	100	100	IFA	USA	Chandrashekar ym. 2008
koira	91,7	88,7		USA	Goldstein ym. 2014
koira	100	57,4	PCR	Saksa	Barth ym. 2014

Snap-testissä käytetään *Borrelia*-vasta-aineiden antigeeninä C6-peptidiä ja *Anaplasma*-vasta-aineiden antigeeninä p44-ulkokalvoproteiinista johdettua synteettistä peptidiä (Barth ym. 2014b). C6 on *Borrelia*-bakteerin genomin VlsE:ssä (variable major protein-like sequence, expressed) sijaitsevan IR6-jakson (invariable region 6) koodaama peptidi. IR-jaksot ovat vaihtelevaan jaksoon kuuluvia pätkiä, joita antigeeninen variaatio ei voi muuttaa (Liang ym. 1999a). IR6 on paitsi pysyvä, myös konservoitunut patogeenisillä borreliakannoilla. IR6 on immunogeenisin *Borrelia*-bakteerin kuudesta IR-jaksosta, ja sitä vastaan suunnatun vasta-ainevasteen on havaittu olevan koirilla nopea ja vahva ja yksinään riittävä diagnostiikassa (Ling ym. 2000a). Kokeellisesti infektoiduilla koirilla havaittiin C6-vasta-ainevaste ensimmäisen kerran 3 viikon kuluttua tartunnasta ja kaikilla tutkituilla koirilla viimeistään 4–5 viikon kuluttua tartunnasta. Vasta-ainetason havaittiin laskevan 1–2 viikkoa antibiootihoidon jälkeen, mutta pysyvän silti havaittavalla tasolla ainakin tutkimuksen keston ajan (69 viikkoa) (Liang ym. 2000b).

3.2.3. Tilastollinen analyysi

Aineiston tilastollisessa analyysissä käytettiin SPSS-ohjelmaa (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Eri muuttujien yhteyttä seropositiivisuuteen tutkittiin yhden muuttujan logistisella regressioanalyysillä ja muuttujien välisiä yhteyksiä analysoitiin ristiintaulukoinnilla. Ristiintaulukoinnissa käytettiin Chi-square -testiä ja Fisher's exact -p-arvoa. Selityksasteen tutkimisessa käytettiin Goodmanin ja Kruskallin tau -arvoa. 95 %:n luottamusvälit laskettiin EpiTools-ohjelmalla (Sergeant ESG, 2015. Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease.) käyttäen Jeffeysin intervallia (Brown ym. 2001).

4 TULOKSET

4.1 Yleistä

Näytteistä löydettiin vasta-aineita molempia tutkittuja patogeeneja kohtaan. *Borrelia*-vasta-aineita oli 60 aikuisella hevosella ja 11 varsalla ja *Anaplasma*-vasta-aineita 20 aikuisella ja 4 varsalla. Sekainfektio oli kaikkiaan 14 aikuisella hevosella ja 2 varsalla. Seroprevalenssit on esitetty taulukossa 5.

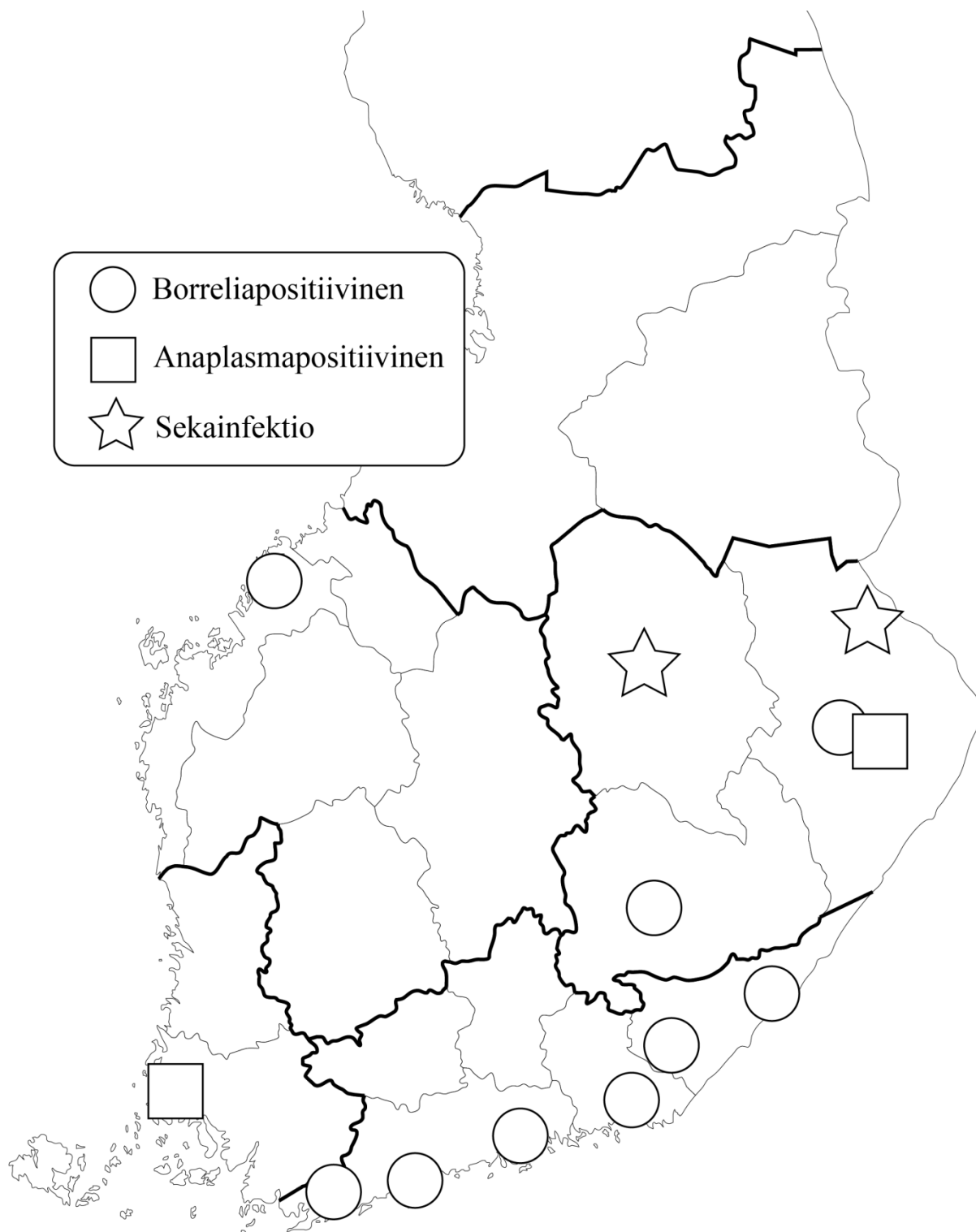
4.2 Varsat

Varsoilla *Borrelia*- tai *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisia näytteitä oli neljällä kuudesta tutkitusta alueesta. Lapin ja Pohjois-Suomen alueilla ei ollut yhtäkään positiivista näytettä. Seropositiiviset näytteet keskittyivät määrällisesti etelärannikolle ja Itä-Suomeen (kuva 7). Huomattavaa on, ettei Ahvenanmaalta ollut lainkaan näytteitä. Korkein *Borrelia*- tai *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisten varsojen osuus oli Itä-Suomessa (kuva 8).

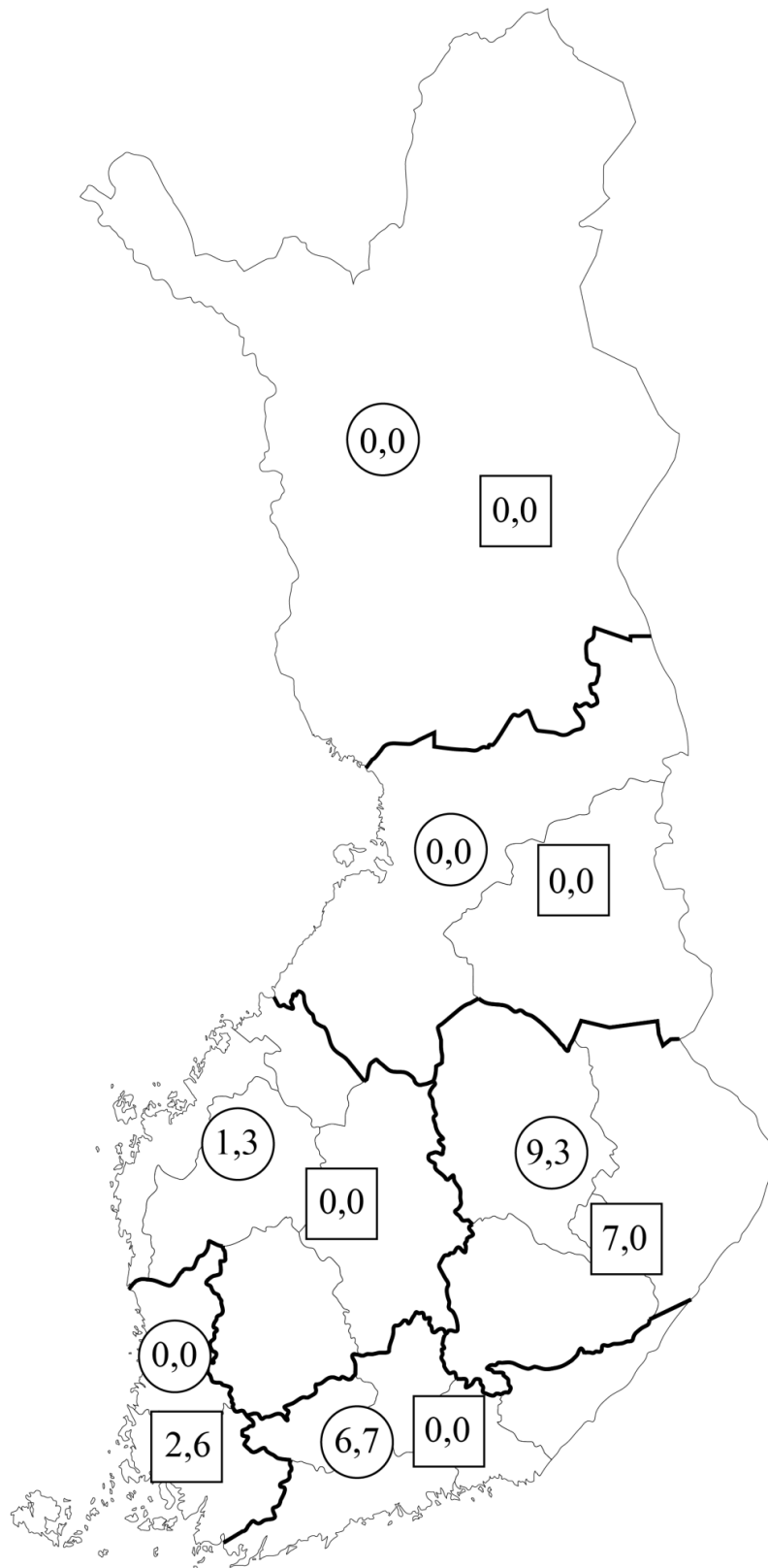
Taulukossa 6 on esitetty seroprevalenssit varsoilla eri muuttujien mukaan. Erot seroprevalensseissa eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Merkitseväksi tekijäksi *Borrelia*-vasta-ainepositiivisuuden suhteen havaittiin ainoastaan *Anaplasma*-seropositiivisuus (taulukko 7). Muuttujien merkitsevyyttä *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisuuden kannalta ei tutkittu hyvin vähäisen positiivisten tulosten määrän (n=4) vuoksi.

Taulukko 5. *Borrelia*- ja *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisten eläinten osuudet kaikista tutkituista eläimistä.

		aikuiset		varsat	
		seroprevalenssi	95 % luottamusväli	seroprevalenssi	95 % luottamusväli
Koko maa	<i>Borrelia</i>	18,8	14,8–23,4	-	-
	<i>Anaplasma</i>	6,3	4,0–9,3	-	-
	sekainfektio	4,4	2,5–7,1	-	-
Manner-Suomi	<i>Borrelia</i>	14,3	10,7–18,6	3,9	2,1–6,7
	<i>Anaplasma</i>	3,7	2,0–6,3	1,4	0,5–3,3
	sekainfektio	-	-	0,7	0,1–2,3



Kuva 7. Varsojen vasta-ainepositiiviset tulokset näytteenottopaikkakunnan mukaan. Huomattavaa on, että Ahvenanmaalta ei ollut lainkaan näytteitä.



Kuva 8. *Borrelia*- ja *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisten varsojen osuus kullakin alueella tutkituista varsoista. Ympyrän sisällä oleva luku kuvaa *Borrelia*- ja neliön sisällä oleva *Anaplasma*-seropositiivisten eläinten osuutta.

Taulukko 6. Vasta-ainepositiivisten varsojen lukumäärät ja osuudet muuttujien mukaan jaoteltuna.

	n	<i>Borrelia</i>		<i>Anaplasma</i>	
		n	%	n	%
Roturyhmä					
suomenhevoset	115	3	2,6	2	1,7
lämminveriset ravihevoset	107	4	3,7	2	1,9
ratsut ja ponit	59	4	6,8	0	0
Sukupuoli					
tamma	142	5	3,5	2	1,4
ori	138	6	4,3	2	1,4
puuttuu	1	0	0	0	0

Taulukko 7. Varsat. *Borrelia*-malli, yhden muuttujan logistisen regression tulokset.

	B	SEM	p-arvo	OR	95 % luottamusväli
Sukupuoli					
ori vs. tamma	0,22	0,618	0,722	1,245	0,371–4,179
Alue					
Eteläinen vs. Keskinen	0,14	0,619	0,821	1,151	0,342–3,873
Pohjoinen vs. Keskinen	-	-	-	-	-
Roturyhmä					
suomenhevonen vs. lämminverinen ravuri	0,371	0,776	0,632	0,69	0,151–3,156
ratsum tai poni vs. lämminverinen ravuri	0,627	0,727	0,388	1,873	0,451–7,779
Anaplasma-vasta-aiheet					
seropositiivinen vs. seronegatiivinen	3,394	1,056	0,001	29,778	3,76–235,854

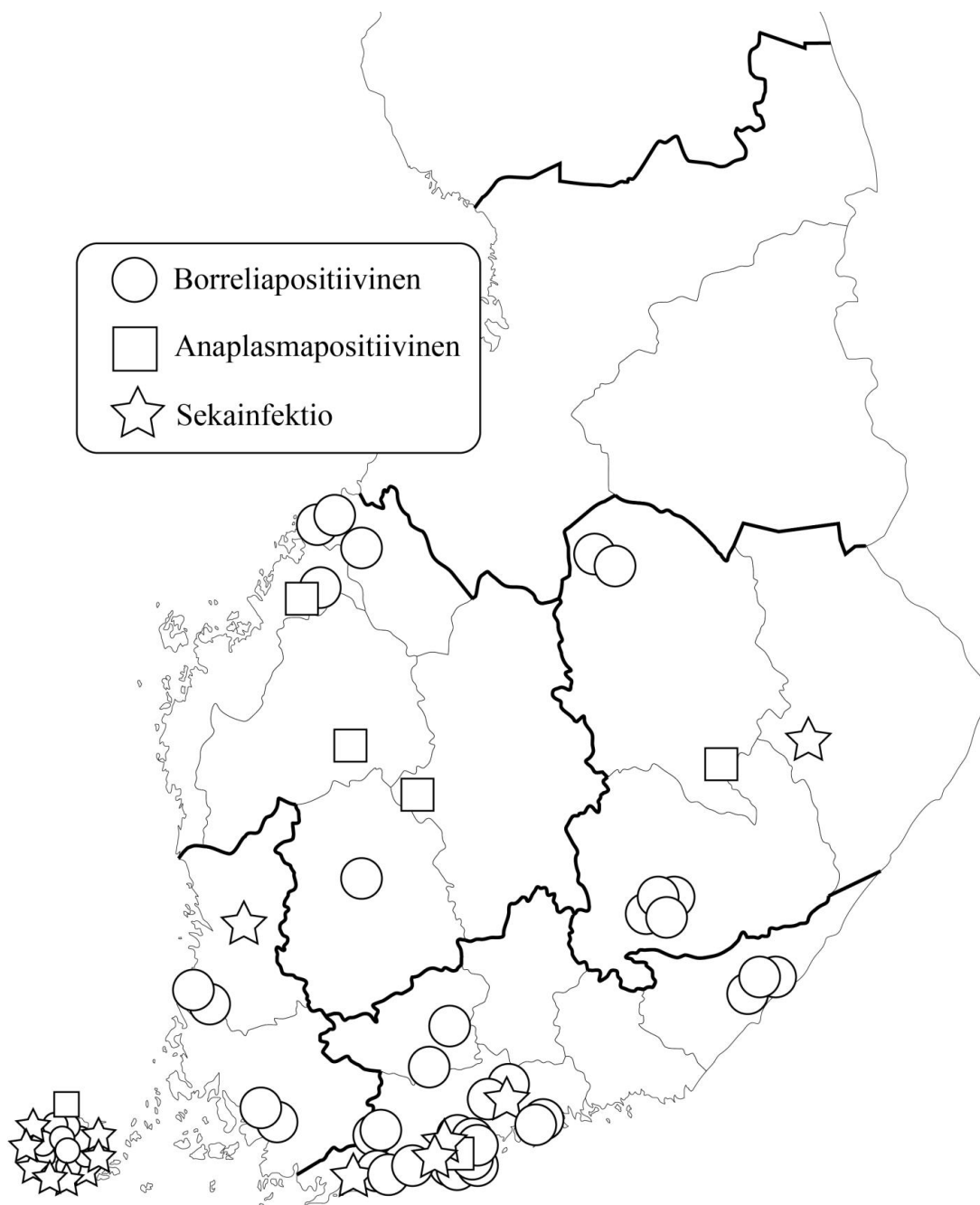
4.3 Aikuiset

Aikuisilla hevosilla seropositiivisia näytteitä oli viidellä seitsemästä alueesta. Lapin ja Pohjois-Suomen alueella ei ollut yhtäkään positiivista verinäytettä. Seropositiiviset näytteet keskittyivät määrällisesti Ahvenanmaalle ja Uudellemaalle (kuva 9). Korkeimmat

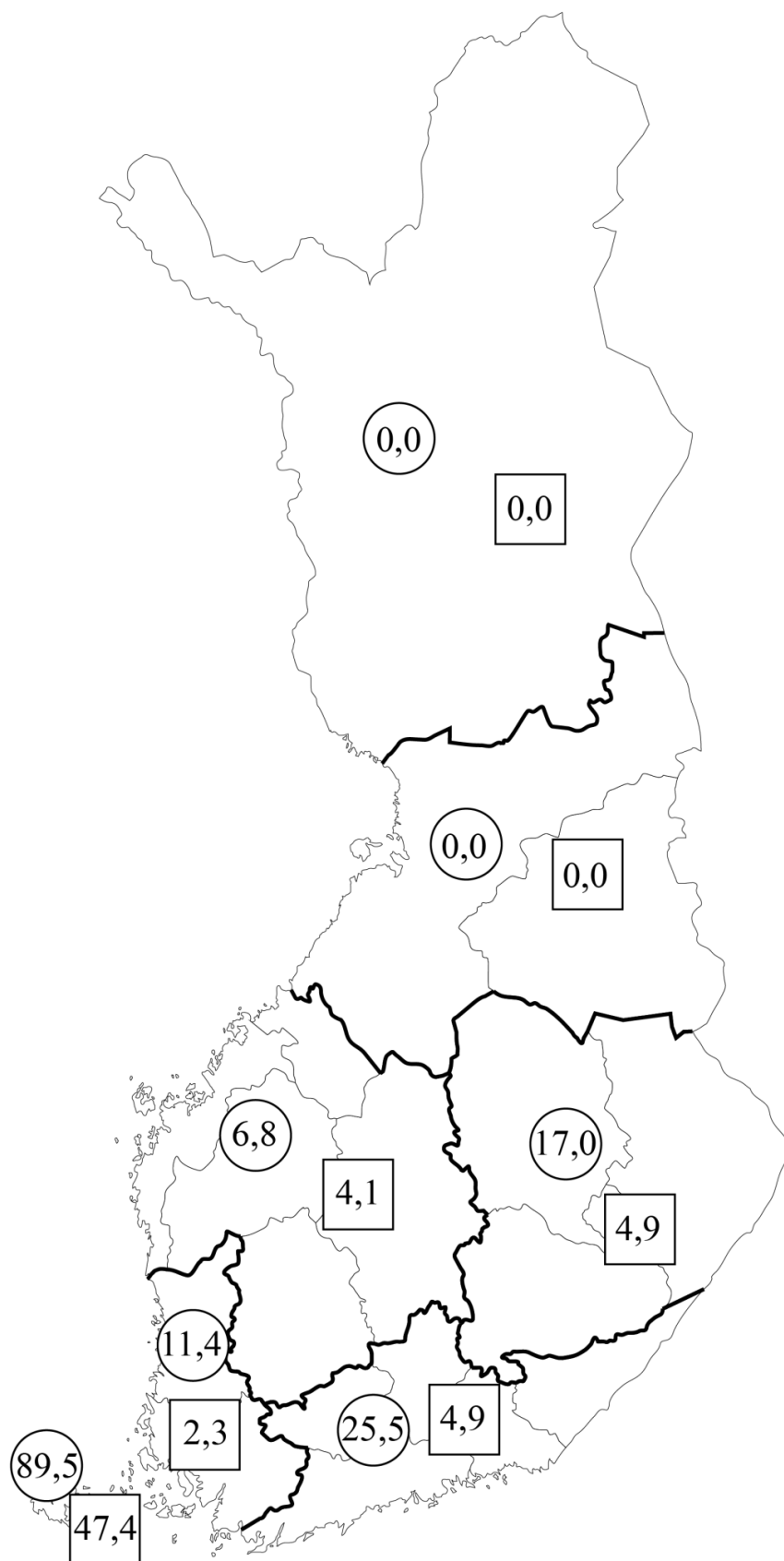
Borrelia- ja *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisten hevosten osuudet olivat järjestyksessä Ahvenanmaalla, Etelä-Suomessa ja Itä-Suomessa (kuva 10).

Seropositiiviset tulokset ja vasta-ainepositiivisten eläinten osuudet on esitetty taulukossa 8. *Borrelia*-seropositiivisuuden suhteen mahdollisesti tilastollisesti merkitseviksi tekijöiksi osoittautuivat hevosessa havaitut puutiaiset, alue, hevosen alkuperämaa, ikä, käyttötarkoitus, roturyhmä sekä *Anaplasma*-seropositiivisuus. Laiduntaminen, laidunkauden pituus, maastokäyttö ja oireet olivat lähes merkitseviä 95 % luottamusvälillä (taulukko 9). *Anaplasma*-seropositiivisuuden kannalta mahdollisesti merkitseviä tekijöitä olivat puutiaiset, alue, hevosen alkuperämaa, ikä sekä *Borrelia*-seropositiivisuus. Oireet olivat lähes merkitsevä tekijä 95 % luottamusvälillä (taulukko 10).

Borrelia-mallissa puutiaisten havaitsemisen selitysaste oli 21,2 % ja *Anaplasma*-mallissa 10,6 %. Muiden muuttujien selitysasteet olivat korkeintaan joitakin prosentteja. Sekä anaplasmoosin sairastanut että borrelioosidiagnoosin saanut hevonen olivat näytteenottohetkellä seronegatiivisia.



Kuva 9. Aikuisten hevosten vasta-ainepositiiviset tulokset paikkakunnan mukaan esitettynä.



Kuva 10. *Borrelia*- ja *Anaplasma*-vasta-ainepositiivisten hevosten osuus kullakin alueella tutkituista hevosista. Ympyrän sisällä oleva luku kuvaa *Borrelia*- ja neliön sisällä oleva *Anaplasma*-seropositiivisten eläinten osuutta.

Taulukko 8. *Borrelia*- ja *Anaplasma*-seroposiitiiviset tulokset ja seroprevalenssit muuttujien mukaan eriteltynä. Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla.

		n	<i>Borrelia</i>		<i>Anaplasma</i>	
			n	%	n	%
Sukupuoli						
	tamma	173	30	17,3	12	6,9
	ruuna	132	27	20,5	7	5,3
	ori	14	3	21,4	1	7,1
	puuttuu	0	0	0	0	0
Ikäryhmä						
	2-5-vuotias	51	6	11,8	1	2
	6-15-vuotias	189	41	21,7	13	6,9
	≥16-vuotias	77	13	16,9	6	7,8
	puuttuu	2	0	0	0	0
Roturyhmä						
	lämminverinen ravihevonen	64	6	9,4	4	6,3
	suomenhevonen	72	3	4,2	0	0
	ratsu	180	51	28,3	16	8,9
	puuttuu	3	0	0	0	0
Käyttötarkoitus						
	ravuri	43	2	4,7	1	2,3
	ratsu	233	52	22,3	16	6,9
	siitos	28	1	3,6	2	7,1
	muu/puuttuu	15	5	33,3	0	0
Alue						
	Ahvenanmaa	19	17	89,5	9	47,4
	Eteläinen	146	31	21,2	6	4,1
	Keskinen	115	12	10,4	5	4,3
	Pohjoinen	39	0	0	0	0
	puuttuu	0	0	0	0	0
Tuonti						
	suomalainen	196	22	11,1	6	3,1
	tuontihevonen	121	38	31	14	11,6
	puuttuu	2	0	0	0	0
Laiduntaako						
	kyllä	273	55	20,1	18	6,6
	ei	32	3	9,4	1	3,1
	puuttuu	14	2	14,3	1	7,1
Laidunkauden pituus						
	ei laidunna	32	3	9,4	1	3,1
	1-3kk	99	24	24,2	4	4
	4kk tai yli	174	31	17,8	14	8
	puuttuu	14	2	14,3	0	0

	n	<i>Borrelia</i>		<i>Anaplasma</i>	
		n	%	n	%
Maastokäyttö					
kyllä	272	54	19,9	17	6,3
ei	35	3	8,6	3	8,6
puuttuu	12	3	25	0	0
Puutiaisten havaitseminen					
kyllä	37	24	64,9	10	27
ei	233	28	12	8	3,4
puuttuu	49	8	16,3	2	4,1
Oireita					
kyllä	53	14	26,4	6	11,3
ei	244	42	17,2	13	5,3
puuttuu	22	4	18,2	1	4,5
<i>Anaplasma</i>-vasta-aineet					
seropositivinen	20	14	70	-	-
seronegatiivinen	299	46	15,4	-	-
<i>Borrelia</i>-vasta-aineet					
seropositivinen	60	-	-	14	23,3
seronegatiivinen	259	-	-	6	2,3

Taulukko 9. *Borrelia*-malli. Yhden muuttujan logistisen regression tulokset. Lyhenne LV merkitsee lämminveristä ravihevosta.

	B	S.E.	p-arvo	OR	95 % luottamusväli
Sukupuoli					
ruuna vs. tamma	0,204	0,295	0,49	1,226	0,688–2,184
ori vs. tamma	0,262	0,682	0,7	1,3	0,342–4,944
Ikäryhmä					
2-5-vuotias vs. varsa	1,186	0,532	0,026	3,273	1,153–9,292
6-15 -vuotias vs. varsa	1,917	0,355	0	6,8	3,393–13,625
≥16-vuotias vs. varsa	1,607	0,433	0	4,986	2,135–11,641
6-15 -vuotias vs. 2–5 -vuotias	0,731	0,469	0,119	2,078	0,829–5,21
≥16-vuotias vs. 2–5 -vuotias	0,421	0,531	0,427	1,523	0,539–4,309
Roturyhmä					
suomenhevonen vs. LV	-0,867	0,729	0,235	0,42	0,101–1,755
ratsu vs. LV	1,341	0,46	0,004	3,822	1,552–9,408
Käyttötarkoitus					
ratsu vs. ravihevonen	1,773	0,741	0,017	5,89	1,378–25,168
siitos vs. ravihevonen	-0,275	1,25	0,826	0,759	0,066–8,791
Alue					
Eteläinen vs. Keskinen	0,839	0,366	0,022	2,314	1,129–4,741
Ahvenanmaa vs. Keskinen	4,29	0,807	0	72,958	14,991–355,075
Ahvenanmaa vs. Manner-Suomi	3,928	0,765	0	50,802	11,332–227,755
Alkuperämaa					
tuontihevonen vs. Suomessa syntynyt	1,287	0,299	0	3,621	2,014–6,51
Anaplasma phagocytophilum -vasta-aineet					
seropositivinen vs. seronegatiivinen	2,552	0,514	0	12,833	4,69–35,117
Laiduntaminen					
laiduntaa vs. ei laidunna	0,892	0,625	0,154	2,439	0,716–8,302
Laidunkauden pituus					
1-3 kk vs. 0 kk	1,129	0,65	0,082	3,093	0,865–11,064
≥4 kk vs. 0 kk	0,74	0,638	0,246	2,096	0,6–7,318
Maastokäyttö					
ulkoilee maastossa vs. ei ulkoile	0,972	0,623	0,119	2,642	0,78–8,953
Puutiaisten havaitseminen					
havaittu vs. ei havaittu	2,604	0,399	0	13,516	6,184–29,544
Oireet					
oireita vs. ei oireita	0,546	0,355	0,124	1,726	0,861–3,460

Taulukko 10. *Anaplasma*-malli. Yhden muuttujan logistisen regression tulokset. Lyhenne LV merkitsee lämminveristä ravihevosta.

	B	S.E.	p-arvo	OR	95 % luottamusväli
Sukupuoli					
ruuna vs. tamma	-0,286	0,49	0,56	0,751	0,287–1,964
ori vs. tamma	0,032	1,08	0,977	1,032	0,124–8,571
Ikäryhmä					
2–5-vuotias vs. varsa	0,326	1,129	0,773	1,385	0,152–12,649
6–15 -vuotias vs. varsa	1,632	0,58	0,005	5,115	1,642–15,937
≥16-vuotias vs. varsa	1,767	0,659	0,007	5,852	1,608–21,296
6–15-vuotias vs. 2–5 -vuotias	1,306	1,05	0,213	3,693	0,472–28,920
≥16-vuotias vs. 2–5 -vuotias	1,441	1,096	0,188	4,225	0,493–36,191
Roturyhmä					
ratsum. LV	0,381	0,579	0,511	1,463	0,470–4,552
Käyttötarkoitus					
ratsum. ravuri	1,13	1,044	0,279	3,097	0,400–23,986
siitos vs. ravuri	1,173	1,25	0,348	3,231	0,279–37,431
Alue					
Eteläinen vs. Keskinen	0,059	0,619	0,924	0,943	0,280–3,171
Ahvenanmaa vs. Keskinen	2,986	0,648	0	19,8	5,558–70,541
Ahvenanmaa vs. Manner-Suomi	3,163	0,553	0	23,645	8,004–69,857
Alkuperämaa					
tuontihevonen vs. Suomessa syntynyt	1,421	0,503	0,005	4,143	1,547–11,98
<i>Borrelia burgdorferi</i> -vasta-aineet					
seroposiitiivinen vs. seronegatiivinen	2,552	0,514	0	12,833	4,69–35,117
Laiduntaminen					
laiduntaa vs. ei laidunna	0,783	1,045	0,454	2,188	0,282–16,962
Laidunkauden pituus					
1-3kk vs. 0kk	0,266	1,137	0,815	1,305	0,141–12,120
≥4 kk vs. 0kk	0,998	1,054	0,344	2,712	0,344–21,387
Maastokäyttö					
ulkoilee maastossa vs. ei ulkoile	-0,341	0,654	0,602	0,711	0,197–2,561
Puutiaisten havaitseminen					
havaittu puutiaisia vs. ei havaittu	2,343	0,516	0	10,417	3,787–28,651
Oireet					
oireita vs. ei oireita	0,819	0,519	0,114	2,268	0,821–6,271

4.3.1 Muuttujien väliset riippuvuudet

Puutiaisten havaitsemisen suhteen merkitseviä tekijöitä olivat roturyhmä ($p=0,002$), käyttötarkoitus ($p=0,004$), alue ($p=0,000$) ja laidunkauden pituus ($p=0,048$). Maastokäyttö ei ollut merkitsevää ($p=0,276$). Sekä ratsurotuiset että ratsuna käytettävät hevoset erosivat merkitsevästi muista ryhmistä: ratsurotuisilla puutiaisia oli havaittu 30/151 (19,9 %) ja ratsuna käytettävillä 34/168 (20,2 %) kun suomenhevosilla havaintoja oli vain 2/61 (3,3 %) ja lämminverisillä ravihevosilla 5/56 (8,9 %). Neljän kuukauden ajan tai pidempään laiduntavilla oli havaittu enemmän puutiaisia kuin niillä, jotka laidunsivat 1–3 kuukauden ajan. Puutiaisia oli havaittu vain yhdellä niistä hevosista, jotka eivät laiduntaneet lainkaan. Ahvenanmaalla 17/17 (100 %) vastaajaa raportoi havainneensa hevosessaan puutiaisia, Eteläisellä alueella 19/132 (14,4 %), Keskisellä alueella vain 1/83 (1,2 %) ja Pohjoisessa havaintoja oli 0/38 (0 %).

Oireiden suhteen merkitseviä tekijöitä olivat rotu ($p=0,035$), käyttötarkoitus ($p=0,000$), puutiaisten havaitseminen ($p=0,001$), alue ($p=0,006$) ja maastokäyttö ($p=0,006$). Ikä oli lähes merkitsevä ($p=0,093$). Oireilevilla hevosilla puutiaisia oli havaittu 14/44 (31,8 %) ja oireettomilla vain 23/219 (10,5 %). Ratsurotuisissa hevosissa oli suhteessa eniten oireilevia ja lämminverisissä ravihevosissa vähiten. Käyttötarkoituksenkin mukaan jaoteltuna ratsut olivat yliedustettuina oireilevien joukossa. Oireilevia hevosia raportoitiin suhteessa eniten Ahvenanmaalta ja Eteläiseltä alueelta. Maastossa ulkoilevilla hevosilla 52/259 (20,1 %) oli oireita, kun vain yhdellä niistä jotka eivät ulkoile (2,9 %) raportoitiin oireita. Iäkkäissä hevosissa oli suhteessa eniten oireilevia.

Asuinpaikka oli lisäksi merkitsevä alkuperämaan ($p=0,006$), laiduntamisen ($p=0,002$), roturyhmän ($p=0,001$) ja käyttötarkoituksen ($p=0,000$) suhteen. Ahvenanmaalla ja Eteläisellä alueella oli keskimääräistä enemmän sekä tuontihevosia että ratsuhevosia ja näillä alueilla myös laiduntaminen oli yleisintä.

Ikä oli merkitsevä myös rodun ($p=0,000$) ja käyttötarkoituksen ($p=0,000$) ja asuinpaikan ($p=0,000$) suhteen. Lämminverisistä ravihevosista useat olivat nuoria, kun taas ratsut olivat keskimäärin keski-ikäisiä (6–15-vuotiaita) tai iäkkäitä (≥ 16 -vuotiaita). Myös ravihevosina käytettävät hevoset olivat pääsääntöisesti nuoria ja ratsut ja siitoseläimet iäkkäämpiä.

Roturyhmä ja käyttötarkoitus olivat kytköksissä toisiinsa ($p=0,000$): lämminverisiä ravihevosia oli eniten ravi- ja siitoskäytössä, mutta myös ratsuina, ja suomenhevosia oli eniten ratsuina mutta myös ravihevosina. Rodultaan ratsuiksi luokitellut olivat käyttötarkoitukseltaan pääsääntöisesti ratsuja. Laiduntaminen ei ollut merkitsevää

roturyhmän suhteen ($p=0,810$) mutta käyttötarkoituksen suhteen kylläkin ($p=0,007$). Laiduntaminen oli yleisempää ratsuhevosilla, joista 211/232 (90,9 %) laidunsi, kuin ravihevosilla (laiduntavia 29/39 eli 74,3 %) ja siitoseläimillä (laiduntavia 1/27 eli 3,7 %). Maastokäyttö oli merkitsevä roturyhmän ($p=0,000$) ja käyttötarkoituksen suhteen ($p=0,000$) ja yleisintä maastossa liikkuminen oli ratsuhevosilla.

Alkuperämaa oli lisäksi merkitsevä roturyhmän ($p=0,000$), käyttötarkoituksen ($p=0,000$) ja maastokäytön ($p=0,025$) suhteen. Ratsurotuisissa hevosissa oli tuontihevosiä 110/179 (61,5 %), kun lämminverisissä ravihevosissa vain 10/64 (15,6 %). Kaikki suomenhevoset olivat syntyneet Suomessa. Ratsuina käytettävissä hevosissa tuonteja oli 103/231 (44,6 %) ja ravihevosissa 3/43 (7,0 %). Tuontihevosiä likutettiin maastossa enemmän kuin Suomessa syntyneitä.

5 POHDINTA

5.1 Tutkimuspopulaatio

Tutkimuspopulaatioon haluttiin ottaa runsaasti varsoja, sillä varsojen verinäytteistä arveltiin saatavan todenmukaisin kuva seroprevalenssista ja tutkittavien bakteerien esiintymisestä eri alueilla. Varsojen oletettiin eläneen syntymänsä ja näytteenottohetken välisen ajan synnyinseudullaan tai melko lähellä sitä, jolloin mahdolliset tartunnat kertoisivat juuri kyseisen alueen tilanteesta. Aikuiset hevoset sen sijaan ovat voineet asua eri puolilla maata tai tulla ulkomailta Suomeen.

Tutkimuspopulaation valinnassa ei suoritettu varsinaista satunnaisotantaa. Varsat valittiin etsimällä laboratorion kirjanpidosta marraskuun 2011 ja tammikuun 2012 välillä otetuista näytteistä riittävä määrä verinäytteitä kultakin alueelta. Aikuiset hevoset valikoituivat tutkimuspopulaatioon puhtaasti käytännöllisistä syistä. Näytteitä pyrittiin saamaan kattavasti eri puolilta Suomea, mutta muunlaista valintaa ei suoritettu. Opiskelijat ottivat näytteitä tutuilta talleilta, ja osa vieraili useammassakin paikassa saadakseen näytteitä hieman laajemmalta alueelta kotiseudullaan. Kunkin alueen näytteet on kerätty muutamalta satunnaiselta tallilta, mutta koko maata ajatellen näytteitä kuitenkin saatiin melko kattavasti. Aikuisten hevosten näytteiden alueellinen jakautuminen vastaa Hippoksen

arvioita kullakin alueella elävien hevosten määrästä (taulukko 1), joten näytteitä saatiin tässä suhteessa sopivasti jokaiselta alueelta.

Hevosenomistajien ja -haltijoiden täytettävästi tarkoitettun kyselylomakkeessa oli joitakin tulkinnanvaraisuuksia sekä huomioonarvoisia kohtia. Ensinnäkin lomakkeen käyttötarkoitus-kohdassa oli luokiteltu erikseen ravihevonen, ratsu ja harrastehevonen. Käytännöllisempi jako olisi ollut ravihevonen, kilparatsu ja harrastehevonen, sillä se olisi erotellut paremmin hevosammattilaisten omistamat ”ammattiuurheilijat” (ravihevokset), mahdollisesti vähemmän erikoistuneet ”ammattilaiset” (kilparatsut) sekä muut vaihtelevassa harrastekäytössä pidetyt hevoset (harrastehevokset). Lisäksi vastaajien omat arviot hevosen laiduntamisesta ja maastokäytöstä oletettavasti vaihtelevat. Hevonen voidaan esimerkiksi viedä kesälaitumelle pois kotitallilta tai jopa toiselle paikkakunnalle, tai se voi laiduntaa pellonreunassa kotiseudulla. ”Maastokäyttöä” taas voivat tulkintatavasta riippuen olla sekä käyrryajo maantiellä ja ratsastaminen metsäpoluilla tai niityllä. Kohta, jossa kysyttiin hevosen terveydentilaa, olisi kaivannut erityistä tarkennusta. Oireista ja terveydentilasta olisi kannattanut kysyä esimerkiksi viimeisten yhden, kahden tai viiden vuoden aikajänteellä.

Suomessa arvioitiin olevan vuoden 2012 lopussa yhteensä noin 74 100 hevosta, joista 19 700 (26 %) suomenhevosia, 25 450 (34 %) lämminverisiä ravihevosia, 18 800 (26 %) ratsuja ja 10 150 (14 %) poneja (Suomen Hippos ym. 2012). Edelleen Hippoksen tilastojen mukaan Suomessa syntyi vuonna 2011 yhteensä 4030 varsaa, joista 1360 (33,75 %) oli suomenhevosvarsoja, 1590 (39,45 %) lämminverisiä ravihevosia sekä 1080 (26,80 %) ratsuja ja poneja (Suomen Hippos ym. 2011). Aineistossamme suomenhevosten määrä on melko todenmukainen, mutta lämminveriset ravihevokset ovat aliedustettuina ja ratsut ja ponit yliedustettuina. Suomenhevosvarsat olivat lievästi yliedustettuina ja ratsu- ja ponivarsat aliedustettuina.

Hippoksen mukaan vuonna 2012 Suomeen tuotiin 1400 ratsuhevosta ja ponia sekä pysyvästi 312 ja tilapäisesti 568 ravihevosta. (Suomen Hippos ym. 2012) Yleisimpiä tuontimaita ovat olleet Saksa, Ruotsi ja Baltian maat (Suomen Hippos ym. 2011). Tilastoa Suomessa elävien hevosten alkuperämaista tai Suomen ulkopuolella syntyneiden hevosten osuudesta ei ole. Hippoksen tilastoinnin mukaan Suomessa kuitenkin syntyy vuosittain enemmän varsoja kuin Suomeen tuodaan hevosia ulkomailta ja vienti ulkomaille on verrattain vähäistä (Suomen Hippos ym. 2012), joten arvioin että tuontihevosten hieman 38

prosentin osuus aineistossamme on korkeampi kuin tuontihevosten osuus koko Suomen hevoscannasta todellisuudessa on.

5.2 Näytteenottoajankohta

Tutkimuspopulaation varsat olivat syntyneet näytteenottoa edeltävänä keväänä ja kesänä. Aikuisten verinäytteet otettiin samana vuodenaikana kuin varsojen näytteet. Seroprevalenssin arveltiin olevan korkeimmillaan joitakin kuukausia kevästä syksyyn kestävä puutiaiskauden jälkeen. Toinen syy ajankohdan valintaan oli puhtaasti käytännöllinen, sillä opiskelijoiden oli helpointa ottaa ja kuljettaa näytteet Helsinkiin joululomien aikaan. Ruotsissa hevosten *Borrelia*-vasta-ainetasojen on todettu olevan korkeimmillaan heinäkuun ja syyskuun välisenä aikana verrattuna muihin ajankohtiin. Anaplasma-vasta-ainetasot taas olivat matalimmillaan huhtikuun ja syyskuun välisenä aikana (Egenvall ym. 2001). Vuodenajan merkitys on havaittu myös ihmisillä (Wittesjö ym. 2001). Tämän tutkimuksen tulos olisi voinut olla hieman erilainen, mikäli verinäytteet olisi otettu esimerkiksi syksyllä tai keväällä. Egenvallin ym. (2001) tulosten perusteella *Borrelia*-seroprevalenssi olisi saattanut olla keväällä tai syksyllä korkeampi ja *Anaplasma*-seroprevalenssi taas matalampi kuin nyt.

5.3 Näytteiden käsittelyyn liittyvät tekijät

Verinäytteiden käsittely ei ollut täysin johdonmukaista eikä noudattanut täysin SNAP-testin valmistajan ohjeita. Valmistajan mukaan näytteenä käytettävä veri voi olla kokoverta, seerumia tai plasmaa. Kokoverta saisi säilyttää jääkaapissa maksimissaan viikon ajan ennen testausta. Plasman ja seerumin saisi pakastaa ja sentrifugoida sulatuksen jälkeen ennen testaamista. Hemolyysin ei pitäisi vaikuttaa testin tuloksiin (Idexx 2015). Aineistossamme varsojen verinäytteet oli pakastettu kokoverenä ja aikuisten hevosten verinäytteistä osa pakastettiin kokoverenä ja osa plasmana. Näytteiden pakastamiseen päädyttiin, sillä näytteenoton järkevä ajoittaminen oli hankalaa ja säilytysajat näytteenottopaikkakunnilla saattoivat muodostua pitkiksi. Koska näytteiden pakastaminen kuitenkin oli hyväksyttyä ja hemolyysin ei pitäisi haitata testin suorittamista (Idexx 2015), en usko näytteiden käsittelyn vaikuttaneen tuloksiimme merkittävästi.

5.4 SNAP-testin käyttökelpoisuus hevosten puutiaisvälitteisten tartuntojen diagnostiikassa

Yhdysvalloissa tehtyjen tutkimusten mukaan SNAP-testi on hevosilla käyttökelpoinen, joskin virhenegatiivisille tuloksille altis menetelmä (Johnson 2008, Chandrashekar 2008, Wagner ym. 2013). Barth ym. (2014a) kuitenkin totesivat koiria koskevassa tutkimuksessaan, että Yhdysvalloissa tehdyt tutkimukset eri testimenetelmien sensitiivisyydestä ja spesifisyydestä *Borrelia*-diagnoosiikassa eivät olisi sovellettavissa Euroopassa, sillä Yhdysvalloissa tunnetaan vain yksi patogeeninen *Borrelia*-laji siinä missä Euroopassa niitä on useita.

SNAP-testi tunnistaa borreliavasta-aineet C6-peptidin avulla. Vaikka C6-peptidiä koodaava IR6-alue on *Borrelia*-bakteerilla hyvin konservoitunut (Liang 2000a), ei tiedetä riittääkö yksi C6-peptidi löytämään kaikkia Euroopassa tavattavia lajeja vastaan muodostuneet vasta-aineet (Barth ym. 2014a). Ihmisiä koskevista tutkimuksista on saatu viitteitä siitä, että testimenetelmä tunnistaisi vasta-aineet myös varmistettua *B. afzelii*- tai *B. garinii* -infektiota sairastavilta ihmisiltä (Liang 2000a). Yhdysvaltalaisilla verinäytteillä C6-ELISA-menetelmän sensitiivisyys oli 85 % (potilaalla varhainen borrelioosi) ja 100 % (potilaalla myöhäinen borrelioosi), kun kliinisesti sairaiden eurooppalaisten potilaiden näytteillä tulokset olivat vastaavasti 83 % ja 95 %. (Liang ym. 1999b, Liang ym. 2000a) Tutkimuksessa merkinä eri alalajien aiheuttamista tartunnoista pidettiin erilaisten taudinkuvien eli niveltulehduksen, neuroborrelioosin ja ihomuutosten esiintymistä potilailla (Liang ym. 2000a). Koirilla taas on epäilty, että *B. afzelii*-tartunnan saaneet koirat olisivat jääneet tunnistamatta SNAP-testiä käyttämällä. Tutkimuksessa kolme Western Blot -menetelmällä seroposiitiviseksi osoittautunutta eläintä saivat SNAP-negatiivisen tuloksen (Barth ym. 2014a). Mikäli testi ei tunnista Euroopassa yleisiä *Borrelia*-alalajeja vastaan muodostuneita vasta-aineita, testin sensitiivisyys ja spesifisyys ovat Euroopassa heikommalla kuin Yhdysvalloissa. On siis mahdollista, että joitakin *Borrelia*-positiivisia hevosia on jäänyt tunnistamatta pikatestillä. Asiaa olisi mielenkiintoista tutkia vertaamalla SNAP-testillä saatuja tuloksia toiseen, eurooppalaisilla näytteillä kohtalaisen luotettavaksi todettuun testiin.

Rokottaminen OspA- tai kokospirokeettarokotteella ei Levyn (2002) ja Liangin ym. (2000) mukaan häiritse C6-perusteista diagnostiikkaa koirilla tai hevosilla (Levy 2002, Liang ym. 2000b). Huomio lienee kuitenkin Suomen kannalta merkityksellinen, sillä koirille rekisteröityä rokotetta tuskin käytetään meillä hevosten rokottamiseen. *Anaplasman* osalta ristireaktio *A. phagocytophilum*in kanssa samankaltaisia bakteereja (esim. *A. platys*)

vastaan muodostuneiden vasta-aineiden kanssa on teoriassa mahdollinen (Barth ym 2014b). *A. platys*-bakteerin aiheuttamia tartuntoja ei kuitenkaan ole todettu Suomessa (Pérez Vera ym. 2014), joten ristireaktiot lienevät hyvin epätodennäköisiä.

Siitä, kuinka korkea *Borrelia*- tai *Anaplasma*-vasta-ainetason on oltava, jotta SNAP-testi tunnistaisi sen, ei ollut saatavilla tietoa. Koska testitulos perustuu sinisen täplän muodostumiseen tietyn ajan kuluessa, tulokset voivat riippua testin tulkitsijasta. Testin suoritusohjeissa neuvotaan tarkistamaan tulos välittömästi kahdeksan minuutin kuluttua testin aloittamisesta, eikä enää kahdeksan minuutin jälkeen muodostuneita värinmuutoksia tulisi pitää positiivisinä tuloksina. On kuitenkin mahdollista, että testejä on välillä luettu liian myöhään, jolloin ylimääräinen värinmuodostus on saattanut aiheuttaa virhepositiivisia tuloksia.

5.5 Seroprevalenssit

Tässä tutkimuksessa todettu *Borrelia*-seroprevalenssi (18,8 %) oli korkeampi kuin Zoonoosikeskuksen (2015) tulos (13 %) ja yllättäen myös korkeampi kuin Egenvallin ym. (2001) Ruotsissa saama tulos (16,8 %). *Anaplasma*-seroprevalenssi oli selvästi matalampi kuin ruotsalaistutkimuksen tulos (16,7 %), mutta lähes sama kuin tuoreessa suomalaistutkimuksissa koirilla todettu seroprevalenssi (5,3 %) (Pérez Vera ym. 2014). Mielenkiintoista kuitenkin on, että koirien *Borrelia*-seroprevalenssi oli vain 2,9 %, eli huomattavan alhainen verrattuna tässä tutkimuksessa saatuun tulokseen.

Seroprevalenssien laskennassa ei ole huomioitu alueen sisäistä vaihtelua. Koska näytteenotto keskittyi osalla alueista vain muutamalle tallille, saatu tulos saattaa kuvata enemmän kyseisten tallien tilannetta kuin koko alueen tilannetta. Lisäksi alueelliset näytemäärät ovat mahdollisesti liian alhaisia yleistysten tekemiseen. Todellinen seroprevalenssi kullakin alueella saattaa erota saadusta tuloksesta sekä testimenetelmän epätäydellisyyden että valintaharhan vuoksi.

5.6 Muuttujien vaikutus seropositiivisuuteen

Yhden muuttujan logistisella regressiolla ja ristiintaulukoinnilla saadaan ainoastaan tulosten alustavaa kuvailua, eikä muiden muuttujien mahdollista vaikutusta tuloksiin ole poistettu. Syy-seuraussuhteita ei voi täysin päätellä näiden tulosten perusteella. Seuraavissa kappaleissa olen pohtinut eri muuttujien merkitystä nyt saatuihin tuloksiin. *Anaplasma*-

seroposiitiivisia aikuisia hevosia oli niin vähän (n=20), että riskitekijöiden analysointi ei välttämättä ole luotettavaa, joten käsittelen lähinnä *Borrelia*-seroposiitivisuudelle altistavia tekijöitä.

5.6.1 Puutiaisten havaitseminen

Vain melko harva omistaja oli havainnut hevosessaan puutiaisia. Puutiaisten havaitseminen oli kuitenkin selvästi merkitsevä tekijä sekä *Borrelia*- että *Anaplasma*-seroposiitivisuuden suhteen. Tulos oli odotettavissa, sillä tartuntaa kantavan puutiaisen purema on käytännössä välttämätön tekijä tartunnan saamiseksi. Puutiaisia havaittiin eniten Ahvenanmaalla ja Etelä-Suomessa, ja Pohjois-Suomessa ei lainkaan, mikä on linjassa puutiaisen oletetun levinneisyysalueen kanssa, ja seroprevalenssit olivat korkeimpia niillä alueilla joilla puutiaisten tiedetään viihtyvän. Puutiaisia oli havaittu yleisimmin ratsuhevosista, vaikka muun rotuisten hevosten raportoitiin ulkoilevan lähes yhtä paljon. Mahdollisesti ratsuhevosia seurataan tarkemmin ja niiden parissa vietetään enemmän aikaa kuin muiden hevosten.

5.6.2 Alue

Ahvenanmaan sekä Etelä- ja Itä-Suomen erottuminen muista alueista olivat hypoteesin mukaisia. Hieman yllättävää oli kuitenkin se, miten selvästi Ahvenanmaa erosi Eteläisestä alueesta ja Manner-Suomesta, vaikka ahvenanmaalaisten puutiaisten korkea infektioaste olikin tiedossa (Wilhelmsson ym. 2013) ja vaikka aiemmassa suomalaistutkimuksessa on saatu samansuuntainen tulos koirilla (Pérez Vera ym. 2014). Tartuntapaine oli sekä *Borrelia* että *Anaplasman* suhteen selvästi korkeampi Ahvenanmaalla kuin muualla Suomessa ja *Borrelia* suhteen Eteläisellä alueella jonkin verran korkeampi kuin muualla Manner-Suomessa.

Lapista ja Kainuusta kerättyjen näytteiden joukossa ei ollut ainoatakaan seroposiitiivista, mikä on linjassa puutiaisen oletetun levinneisyysalueen kanssa. Hevoset kuitenkin voivat vaihtaa omistajaa ja siten asuinpaikkaa useitakin kertoja elämänsä aikana. Lapin ja Pohjois-Suomen hevosten joukossa oli sekä tuontihevosia että muualta Suomesta muuttaneita, joten vaikka puutiasvälitteisen tartunnan saaminen on Pohjois-Suomessa käytännössä poissuljettua, voisi olettaa että joukossa olisi kuitenkin ollut jokin muualta tartunnan saanut eläin.

Ahvenanmaalta ei valitettavasti saatu käyttöön varsojen verinäytteitä. Koska aikuisten hevosten seroprevalenssit Ahvenanmaalla olivat erittäin korkeita, olisi ollut mielenkiintoista tutkia myös ahvenanmaalaisten varsojen verinäytteitä.

5.6.3 Alkuperämaa

Hevosen alkuperämaan merkitystä selvittäessä hevoset päädyttiin jakamaan vain Suomessa ja Suomen ulkopuolella syntyneisiin. Koska hevoset olivat peräisin yhteensä 21 maasta, tarkemmassa jaossa havainnot useimmista maista olisivat jääneet hyvin vähäisiksi. Lisäksi hevoset ovat voineet elää useammassakin maassa ennen Suomeen tuontiaan, jolloin mahdollisen tartunnan ”alkuperämaan” varmistaminen ei olisi ollut mahdollista.

Havainto tuontihevosten korkeammasta seroprevalenssista Suomessa syntyneisiin verrattuna sekä *Borrelia* että *Anaplasman* suhteen vastasi hypoteesia ja oli sikäli mielenkiintoinen, että aiemmissa vastaavissa tutkimuksissa (luettelot kirjallisuuskatsauksessa kohdissa 2.2.6 ja 2.3.5) hevosten alkuperämaata ei ole huomioitu. Oletan, että Suomen lisäksi ainakin niissä maissa, joissa hevoskasvatusta ei harjoiteta merkittävässä laajuudessa, tuontihevosten osuus hevospopulaatiosta on melko korkea. Vaikka tuontihevon on toki voinut saada tartunnan myös nykyisessä kotimaassaan, on mahdollista, että kotoperäiset tartunnat muodostavat vain osan kaikista todetuista tartunnoista.

5.6.4 Ikä

Iän merkisevyys *Borrelia*-seropositiivisuuden suhteen noudatti hypoteesia. Iäkkäät hevoset ovat mahdollisesti ehtineet kohdata useampia tartuntaa kantavia puutiaisia kuin nuoret eläimet. Sekä *Borrelia*- että *Anaplasma*-mallissa varsat erosivat merkitsevästi aikuisista hevosista, mutta aikuisten ikäryhmien kesken eroa ei havaittu. Iän merkitys seropositiivisuuteen on todettu aiemminkin ihmisillä, koirilla ja hevosilla (Carlsson ym. 1998, Egenvall ym. 2000, Egenvall ym. 2001, Hansen ym. 2010, Praskova ym. 2011). Hansen ym. (2010) havaitsivat iän olevan merkitsevä tekijä *Anaplasma*- mutta ei *Borrelia*-seropositiivisuuden suhteen.

5.6.5 Rotu ja käyttötarkoitus

Varsoilla eri roturyhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa, mutta aikuisilla hevosilla *Borrelia*-mallissa ratsurotuiset erosivat merkitsevästi lämminverisistä ravihevosista ja ratsuina käytettävät hevoset ravihevosista. Lienee epätodennäköistä, että rotu itsessään altistaisi eläimen tartunnalle, mutta rotu voi vaikuttaa eläimen fyysisiin ominaisuuksiin, pito-olosuhteisiin ja käyttötarkoitukseen ja mahdollisesti sitä kautta tartuntariskiin. Lisäksi tuontihevosten osuus ratsuhevosista oli korkea, joten on mahdollista että hevosen alkuperämaa aiheuttaa virhettä tuloksiin rodun ja käyttötarkoituksen osalta. Saatu tulos eroaa Egenvallin ym. (2001) tutkimuksen tuloksista, joissa muun kuin kylmä- tai puoliverirodun havaittiin olevan *Borrelia*-seropositiivisuudelle altistava tekijä ruotsalaisilla hevosilla.

5.6.6 Laiduntaminen ja maastokäyttö

Laidunkauden pituus ja maastokäyttö osoittautuivat lähes merkitseviksi tekijöiksi *Borrelia*-seropositiivisuuden suhteen. *Anaplasma*-seropositiivisuuden suhteen tekijät eivät olleet merkitseviä. Puutiaisten havaitsemisen suhteen laidunkausi oli merkitsevä, mutta maastokäyttö ei. Tulos oli odotettavissa, sillä tartuntaa kantaville puutiaisille voi altistua ainoastaan ulkoilemalla puutiaisille sopivilla alueilla. Mielenkiintoista on, että pitkä ≥ 4 kuukauden laidunkausi altistaisi puutiaisille, mutta *Borrelia*-tartunnan kannalta 1–3 kuukauden mittainen laidunkausi olisikin riskitekijä. Tartuntariskin voisi olettaa olevan suurempi niillä hevosilla, jotka laiduntavat pitkään, kuin niillä joiden laidunkausi on lyhyt.

Tulosten mukaan tuontihevosiä liikutetaan maastossa enemmän kuin Suomessa syntyneitä hevosia. Kyseessä lienee harha: merkittävä osa tuontihevosista oli ratsuja, joita liikutetaan maastossa keskimäärin enemmän kuin muita hevosia, joten alkuperämaa ei luultavasti ole todellinen vaikuttava tekijä.

5.6.7 Seropositiivisuus toiselle tutkittavalle patogeenille

Anaplasma-seropositiivisuus oli tilastollisesti merkitsevä *Borrelia*-seropositiivisuuden suhteen ja samoin *Borrelia*-seropositiivisuus oli *Anaplasma*-seropositiivisuuden suhteen merkitsevä sekä varsoilla että aikuisilla hevosilla. Varsoilla tulos ei kuitenkaan välttämättä ole luotettava positiivisten tulosten vähäisen määrän ($n_1=11$ ja $n_2=4$) vuoksi. Tulos oli odotettavissa, sillä bakteereilla on yhteinen vektori. Samaan tulokseen ovat päätyneet jotkin

aiemmat tutkimukset hevosilla (Egenvall ym. 2001, Hansen ym. 2010) ja ihmisillä (Wittsejö ym. 2001).

5.6.8 Oireet

Subkliiniset *Borrelia*-tartunnat ovat yleisiä, sillä suurin osa hevosista oli ollut näytteenottohetkellä ja lähimenneisyydessä terveitä ja oireettomia. *Borrelia*-mallissa oireet olivat seropositiivisuuden suhteen lähes merkitsevä tekijä ($p=0,114$). Hevosen rotu saattaa vaikuttaa tulokseen, sillä oireita raportoitiin merkitsevästi enemmän ratsuhevosilta kuin ravihevosilta ja ratsuhevosilla tartuntapaine oli myös korkeampi kuin muilla roduilla. Mahdollisia syitä ravihevosten näennäiseen oireettomuuteen voivat olla niiden keskimäärin nuori ikä sekä se, että sairasteleva tai huonosti suorittava hevonen luultavasti poistetaan ravikäytöstä melko nopeasti. Ratsut taas olivat keskimäärin iäkkäämpia kuin ravurit ja sairastelevasta ratsusta, etenkin harrastusmielessä pidettävästä, tuskin luovutaan kovin helposti. Tulos vaatii muiden muuttujien vaikutuksen poissulkemista tarkemmalla analyysillä sekä jatkotutkimuksia, mutta nyt saadun tuloksen perusteella *Borrelia*-tartunnan yhteyttä oireiluun ei voida poissulkea.

Aiemmissa tutkimuksissa on saatu vaihtelevia tuloksia oireiden suhteen. Egenvall ym. (2001) eivät havainneet merkitsevää eroa *Borrelia*-seroprevalenssissa ”terveiden” ja ”sairaiden” hevosten välillä (Egenvall ym. 2001). Bernhard ym. (1990) eivät havainneet tilastollisesti merkitsevää eroa seropositiivisten ja -negatiivisten lihas- tai hermosto-oireisten hevosten välillä. Manion ym. (2001) sen sijaan löysivät vasta-aineita yleisemmin kliinisesti sairailta kuin terveiltä hevosilta, joskin tutkittujen hevosten määrä ($n=43$) oli kirjoittajien mukaan liian alhainen johtopäätösten tekemiseen. Maloney ja Lindenmeyer (1992) tutkivat seropositiivisuuden ja oireilun välistä yhteyttä, ja kysytyistä oireista kipuoireilun havaittiin olevan kytköksissä seropositiivisuuteen. Kipua kuitenkin pidettiin vaikeasti arvioitavana oireena, jolla saattaa olla useita taustasyitä (Maloney ja Lindenmeyer 1992).

Anaplasma-seropositiivisuus oli oireiden suhteen lähes merkitsevä tekijä. Tulos on mielenkiintoinen, sillä yksikään tutkimukseen osallistuneista hevosista ei ollut näytteenottohetkellä kliinisesti sairas ja anaplasmoosissa vasta-aineita muodostuu yleensä vasta kliinisten oireiden alkamisen jälkeen (Artursson ym. 1999). *Anaplasma*-positiivisia hevosia toki oli tutkimuspopulaatiossa niin vähän, ettei tulosten tulkinta välttämättä ole luotettavaa. Tässä tapauksessa on mielestäni perusteltua olettaa, että hevosten vasta-aineet

ovat peräisin aiemmin saadusta subkliinisestä tartunnasta tai mahdollisesti sairastetusta oireisesta taudista.

Aineistossa oli mukana yksi aiemmin anaplasmoosin sairastanut ja yksi noin kymmenen vuotta sitten borrelioosidiagnoosin saanut hevonen. Kummallakaan hevosella ei todettu vasta-aineita tässä tutkimuksessa. *Anaplasma*- tai *Borrelia*-vasta-aineiden säilymisestä hevosilla ei ole olemassa pitkäaikaista tutkimustietoa, mutta näiden tapausten perusteella vasta-ainetaso ei pysy koholla ainakaan kokonaista vuosikymmentä.

5.7 Johtopäätökset

Borrelia burgdorferi- ja *Anaplasma phagocytophilum* -tartuntoja esiintyy yleisesti suomalaisilla hevosilla. Tartuntapaine oli korkein Ahvenanmaalla sekä Etelä- ja Itä-Suomessa eli alueilla, joissa puutiaisia tiedetään olevan runsaimmin. Puutiaisen purema on käytännössä välttämätön tartunnan saamiseksi, mutta hevosen asuinpaikka sekä pito-olosuhteet voivat altistaa hevosta puutiaisille ja siten tartunnalle.

Suurin osa tutkituista hevosista oli omistajan mukaan terveitä ja oireettomia näytteenottohetkellä, eikä useimmilla ollut tietojemme mukaan myöskään sairaushistoriaa lähimenneisyydessä. Subkliiniset tautitapaukset ovat selvästi yleisiä. *Borrelia*-tartunnan yhteys mahdollisiin kliinisiin oireisiin hevosella vaatii kuitenkin vielä lisätutkimuksia. Lisäksi olisi mielenkiintoista tutkia tamma-varsa -pareja maternaalisten vasta-aineiden käyttäytymisen selvittämiseksi sekä seurata vasta-aineiden säilyvyyttä ottamalla useita verinäytteitä samoista hevosista esimerkiksi vuoden välein.

6 KIITOS

Kiitos kaikille näytteenottoon osallistuneille: eläinlääketieteen opiskelijat vuosikursseilta 64 – 69, hevosenomistajat, Genoscooper Laboratories sekä eläinlääkärit Erica Danielsson ja Anett Pfeifer Ahvenanmaalta. Mirolle kiitos kuvista.

7 KIRJALLISUUS

Alitalo A, Meri T, Rämö L, Jokiranta TS, Heikkilä T, Seppälä IJ, Oksi J, Viljanen M, Meri S. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. Infect Immun 2001, 69: 368–91.

Artursson K, Gunnarsson A, Wikström UB, Engvall EO. A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. Equine Vet J. 1999, 31: 473–477.

Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Dumler JS, Bakken JS. Protection against Ehrlichia equi is conferred by prior infection with the human granulocytotropic Ehrlichia (HGE agent). J Clin Microbiol 1995, 12: 3333–3334.

Barth C, Straubinger RK, Krupka I, Müller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic assays for the detection of Borrelia burgdorferi-specific antibodies in dogs. Vet Clin Pathol 2014a, 43: 496–504.

Barth C, Straubinger RK, Müller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic tools for the detection of Anaplasma phagocytophilum in dogs. Vet Clin Pathol 2014b, 43:180–184.

Bhide M, Yilmaz Z, Golcu E, Torun S, Mikula I. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. Ann Agric Environ Med 2008, 15: 85–90.

Bjöersdorff A, Bergström S, Massung RF, Haemig PD, and Olsen B. Ehrlichia-Infected Ticks on Migrating Birds. Emerg Infect Dis 2001, 7: 877–879.

- Bjöersdorff A, Wittesjö B, Berglun J, Massung RF, Eliasson I. Human granulocytic ehrlichiosis as a common cause of tick-associated fever in Southeast Sweden: report from a prospective clinical study. *Scand J Infect Dis* 2002, 34: 187–191.
- Blanco JR ja Oteo JA. Human granulocytis ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8: 763–772.
- Bosler EM, Cohen DP, Schulze TL, Olsen C, Bernard W, Lissman B. Host responses to *Borrelia burgdorferi* in dogs and horses. *Ann N Y Acad Sci* 1988, 539: 221–34.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2003, 9: 63–70.
- Brissette CA, Haupt K, Barthel D, Cooley AE, Bowman A, Skerka C, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect Immun* 2009, 77: 300–306.
- Brown LD, Cat TT, DasGupta A. Interval Estimation for a proportion. *Stat Sci* 2001, 16: 101–133.
- Browning A, Carten SD, Barnes A, May C, Bennett D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Vet Rec* 1993, 132: 610–611.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease – A tick-borne spirochetosis? *Science* 1982, 216: 1317–1319.
- Burgess EC. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. *Ann N Y Acad Sci* 1988, 539: 235–243.
- Burgess EC, Gillette D, Pickett JP. Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. *JAVMA* 1986, 189: 1340–1342.
- Burgess EC, Mattison M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1987, 191: 1457–1458.
- Carlsson SA, Granlund H, Nyman D, Wahlberg P. IgG seroprevalence of Lyme borreliosis in the population of the Åland islands in Finland. *Scand J Infect Dis* 1998, 30: 501–503.

- Carter SD, May C, Barnes A, Bennett D. *Borrelia burgdorferi* infection in UK horses. *Equine vet J* 1994, 26: 187–190.
- Chandrashekar R, Daniluk D, Moffit S, Lorentzen L, Williams J. Serologic diagnosis of equine borreliosis: Evaluation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 4Dx). *Intern J Appl Res Vet Med* 2008, 6: 145–150.
- Chang YF, Ku YW, Chang CF, Chang CD, McDonough SP, Divers T, Pough M, Torres A. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol* 2005, 107: 285–294.
- Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Vet Pathol* 2000, 37: 68–76.
- Chang Y, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. *Vaccine*. 1999, 18: 540–548.
- Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994, 32:589–595.
- Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* 1997, 89:1111–1119.
- Crippa M, Rais O, Gern L. Investigation on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002, 2: 3–9.
- Divers TJ.. Lyme disease. Teoksessa: Sellon DC ja Long MT. *Equine infectious diseases*. 2 p. Saunders/Elsevier, St. Louis Missouri 2014: 313–315.
- Doudier B, Olano J, Parola P, Brouqui P. Factors contributing to emergence of *Ehrlichia* and *Anaplasma* spp. as human pathogens. *Veterinary Parasitol* 2010, 167: 149–154.
- Dumler JS, Barbet A, Bekker C, Dasch G, Palmer G, Ray S, Rikihisa Y, Rurangirwa F. Reorganization at genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order

Rickettsialas; unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HE” agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Micr 2001, 51: 2145–2165.

Durrani AZ, Goyal SM, Kamal N. Retrospective study on seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in horses in Minnesota. J Equine Vet Sci 2010, 31: 427–429.

Ebani VV, Bertelloni F, Pinzauti P, Cerri D. Seroprevalence of *Leptospira* spp and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. Ann Agr Env Med 2012, 19: 237–240.

Egenvall A, Bonnett B, Gunnarsson A, Hedhammar A, Shoukri M, Bornsten S, Artursson K. Seroprevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991–94. Scand J Infect Dis 2000, 32: 19–25.

Egenvall A, Franzén P, Gunnarsson A, Olsson Engvall E, Vångsholm I, Wikström U-B, Artursson K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Erlichia* spp and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. Prev Vet Med 2001, 49: 191–208.

Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Aberg L, Pringle J. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. J Vet Intern Med 2005, 19: 232–239.

Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Karlstam E, Pringle J. Molecular evidence for persistence of *Anaplasma phagocytophilum* in the absence of clinical abnormalities in horses after recovery from acute experimental infection. J Vet Intern Med 2009, 23: 636–642.

Franzén P, Berg A-L, Aspan A, Gunnarsson A, Pringle JD. Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Rec 2007, 160: 122–125.

Giudice E, Giannetto C, Furco V, Alongi A, Torina A. *Anaplasma phagocytophilum* seroprevalence in equids: a survey in Sicily (Italy). Parasitol Res 2010, 111: 591–595.

Goldstein RE, Eberts MD, Beall MJ, Thattcher B, Chandrashekar R, Alleman AR. Performance comparison of SNAP 4Dx Plus and AccuPlex4 for the detection of Antibodies

to *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. Intern J Appl Res Vet Med 2014, 12: 141–147.

Gribble DH. Equine ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc 1969, 155: 462–469.

Hahn CN, Mayhew IG, Whitwell KE, Smith KC, Carey D, Carter SD, Read RA. A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. Equine Vet J 1996, 28: 84–88.

Hansen MGB, Christofferensen M, Thuesen LR, Petersen MR, Bojesen AM. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. Acta Vet Scand 2010, 52: 3.

Hefty PS, Jolliff SE, Caimano MJ, Wikel SK, Akins DR. Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 2002, 70: 3468–3478.

Hellwage J, Meri T, Heikkilä T, Alitalo A, Panelius J, Lahdenne P, Seppälä IJ, Meri S. The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem 2001, 276: 8427–8435.

Hevosjalostusliitot.

http://hevosjalostusliitot.fi/portaali/fi/rekisterointi_ja_tunnistaminen/index.php, haettu 12.2.2015.

Hilton H, Madigan JE, Aleman M. Rhabdomyolysis associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse. J Vet Intern Med 2008, 22:1061–1064.

Hodzic E, Feng S, Freet KJ, Borjesson DL, Barthold SW. *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. Infect Immun 2002, 70: 3382–3388.

Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ. A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. Prev Vet Med 2004, 65: 173–188.

Idexx Laboratories 2015. SNAP 4Dx Plus, pakkausseloste.

Imai DM, Barr BC, Daft B, Bertone JJ, Feng S, Hodzic E, Johnston JM, Olsen KJ, Barthold SW. Lyme neuroborreliosis in 2 horses. Vet Pathol 2011, 46: 1151–1157.

Jaenson TGT ja Lindgren E. The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. Ticks Tick Borne Dis 2011, 2: 44–49.

James FM, Engiles JB, Beech J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. JAVMA 2010, 237: 1180–1185.

Johnson AL, Divers TJ, Chang YF. Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. J Vet Diagn Invest 2008, 20: 321–324.

Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* tick in urban recreational areas of Helsinki. J Clin Microbiol 1999, 37: 1361–1365.

Junttila J, Tanskanen R, Tuomi J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in selected tick populations in Finland. Scand J Infect Dis 1994, 26: 349–355.

Kallio ER, Begon M, Birtles RJ, Bown KJ, Koskela E, Mappes T, Watts PC. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in rodents in Finland. Vector Borne Zoonotic Dis 2014, 14: 389–393.

Kiss T, Cadar D, Krupaci AF, Bordeanu A, Brudașcă GF, Mihalca AD, Mircean V, Gliga L, Dumitrache MO, Spînu M. Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania. Vector Borne Zoonotic Dis 2011, 11: 1259–1262.

Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell HS, Brade V, Kraiczy P. Kurtenbach K, Sewell HS, Oqden NH, Radolph SE, Nuttall PA. Serum complement sensitivity as key factor in Lyme disease ecology. Infect Immun 1998, 66: 1248–1251.

Käsbohrer, A. and Schönberg, A. Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West). Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1990, 103: 374–378.

Lahdenne P, Oksi J, Pitkäranta A, Vapalahti O. Kuka pelkää punkkia? 1 p. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki 2011.

Laus F, Veronesi F, Passamonti F, Paggi E, Cerquetella M, Hyatt D, Tesei B, Fioretti DP. Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. J Vet Med Sci 2013, 75: 715–720.

Leblond A, Pradier S, Pitel PH, Fortier G, Boireau P, Chadoeuf J, Sabatier P. An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. Rev Sci Tech 2005, 24: 899–908.

Lehmann K. Kannattaako koira rokottaa borrelioosia vastaan? Sic!-verkkolehti 19.6.2013 http://sic.fimea.fi/2_2013/kannattaako_koira_rokottaa_borrelioosia_vastaan luettu 1.1.2015

Lepidi H, Bunnell JE, Martin ME, Madigan JE, Suen S, Dumler JS. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. J Trop Med Hyg 2000, 62: 29–37.

Levi O, Waner T, Banerth G, Keysary A, Bruchim Y, Silverman J, Harrus S. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* among healthy dogs and horses in Israel. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2006 53: 78–80.

Levy SA. Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. Vet Ther 2002, 3: 420–424.

Liang FT, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu CM, Lobet YN, Ruscio M, Voet PE Jr, Weynants VE, Philipp MT. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* sl. J Infect Dis 2000a, 182: 1455–1562.

Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 2000b, 38: 4160–4166.

Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 1999a, 67: 6702–6706.

Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJB, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a

peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J Clin Microbiol 1999b, 37: 3990–3996.

Madigan JE, Hietala S, Chalmers S, DeRock E. Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California. J Am Vet Med Assoc 1990, 196: 1962–1964.

Madigan JE, Gribble D. Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). J Am Vet Med Assoc 1987, 190: 445–448.

Madigan JE, Hietala S, Chalmers S, DeRock E. Seroepidemiologic survey of antibodies to *Ehrlichia equi* in horses of northern California. J Am Vet Med Assoc 1990, 196: 1962–1964.

Maloney EM, Lindenmayer JL. Seroprevalence and clinical signs of Lyme disease. Eq Prac 1992, 14:15–19.

Manion TB, Bushmich SL, Khan IM, Dinger J, Werner H, Mittel L, Laurendeau M, Reilly M. Suspected clinical Lyme disease in horses: Serological and antigen testing differences between clinically ill and clinically normal horses from an endemic region. J Equine Vet Sci 2001, 21: 229–234.

Manion TB, Khan MI, Dinger J, Bushmich SL. Viable *Borrelia burgdorferi* in the urine of two clinically normal horses. J Vet Diagn Invest 1998,10: 196–199.

Maurizi, L ym. Seroprevalence survey of Equine Lyme borreliosis in France and Sub-Saharan Africa. Vector Borne Zoonotic Dis 2010, 10: 535–537.

Meriläinen L, Herranen A, Schwarzbach A, Gilbert L. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. Microbiology 2015, 161: 516–527.

Metcalf KB, Lilley CS, Revenaugh MS, Glaser AL, Metcalf ES. The prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* found in horses residing in the Northwestern United States. J Equine Vet Sci 2008, 28: 587–589.

Montandon CE, Yoshinari NH, Milagres BS, Mazioli R, Gomes GG, Moreira HN, Padilha Ade F, Wanderley GG, Mantovani E, Galvão MA, Langoni H, Mafra C. Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2014, 23: 287–290.

Mäkinen J, Vuorinen I, Oksi J, Peltomaa M, He Q, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of granulocytic Ehrlichia and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks collected from Southwestern Finland and from Vorms Island in Estonia. APMIS 2003, 111: 355–362

Nolen-Walston RD, D'Oench SM, Hanelt LM, Sharkey LC, Paradis MR. Acute recumbency associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in a horse. J Am Vet Med Assoc 2004, 224: 1964–1966.

Oksi J, Seppälä IJT, Hytönen J. Borrelia burgdorferi ja Lyme borreliosis. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Duodecim 2010. Verkkojulkaisu.

Pérez Vera C, Kapiainen S, Junnikkala S, Aaltonen K, Spillmann T, Vapalahti O. Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. Parasite Vector 2014; 7: 285

Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. Parasitology 2004, 129: 191–220.

Praskova I, Bezdekova B, Zeman P, Jahn P. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Czech Republic. Ticks Tick Borne Dis 2011, 2: 111–115.

Priest HL, Irby NL, Schlafer DH, Divers TJ, Wagner B, Glaser AL, Chang YF, Smith MC. Diagnoses of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. Vet Ophthalmol 2012, 15: 398–405.

Pusterla N, Leutenegger CM, Chae JS, Lutz H, Kimsey RB, Dumler JS, Madigan JE. Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. J Clin Microbiol 1999, 37: 4042–4044.

Pusterla N, Lutz H, Braun U. Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. Vet Rec 1998, 143: 303–305.

Pusterla N ja Madigan JE. *Anaplasma phagocytophilum* infection. Teoksessa: Sellon DC ja Long MT. Equine infectious diseases. Saunders/Elsevier, St Louis Missouri 2014: 344–347.

- Pusterla N, Anderson RJ, House JK, Pusterla JB, DeRock E, Madigan JE. Susceptibility of cattle to infection with *Ehrlichia equi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Vet Med Assoc* 2001, 218: 1160–1162.
- Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 2012, 10: 87–99.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PB. Equine granulocytic anaplasmosis (Equine granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophila*). Teoksessa: *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. p. Saunders Ltd, Philadelphia 2007a: 1464–1466.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PB. Tick-borne fever. Teoksessa: *Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. p. Saunders Ltd, Philadelphia 2007b: 1459–1462.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 2005, 436: 573–537.
- Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a meta-analysis. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71: 7203–7216.
- Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev* 2011, 24: 469–489.
- Said BM, Belkahia H, Héni MM, Bouattour A, Ghorbel A, Gharbi M, Zouari A, Darqhouth MA, Messadi L. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in well maintained horses from northern Tunisia. *Trop Biomed* 2014, 31: 432–440.
- Schuijt TJ, Hovius JW, van Burgel ND, Ramamoorthi N, Fikrig E, van Dam AP. The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect Immun* 2008, 76: 2888–2894.
- Sears KP, Divers TJ, Neff RT, Miller WH Jr, McDonough SP. A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Vet Dermatol* 2012, 23: 153–156.

Seppänen M, Vapalahti O. Anaplasma, ehrlichiat ja neoriketsiat. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim 2010. Verkkojulkaisu.

Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. Parasit Vectors 2010. 3: 66.

Sillanpää H. Novel immunological markers of Lyme Borreliosis. Department of bacteriology and immunology, Faculty of Medicine, University of Helsinki. Helsinki 2014.

Katsauksessa Singh SK, Girschick HJ. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Lancet Infect Dis 2004, 4: 575–583.

Siska WD, Tuttle RE, Messick JB, Bisby TM, Toth B, Kritchevsky JE. Clinicopathologic characterization of six cases of Equine Granulocytic Anaplasmosis in a nonendemic area (2008-2011). J Equine Vet Sci 2013, 33: 653–657.

Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet 2012, 379: 461–473.

Stannard AA, Gribble DH, Smith RS. Equine ehrlichiosis: A disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. Vet Rec 1969, 84: 149–150.

Stefanciková A, Adaszek Ł, Pet'ko B, Winiarczyk S, Dudinák V. Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. Ann Agric Environ Med 2008, 15: 37–43.

Štefančíková A, Derdáková M, Škardová I, Szešáková E, Čisláková L, Kováčová D, Stanko M, Pet'ko B. Some epidemiological and epizootiological aspects of Lyme borreliosis in Slovakia with the emphasis on the problems of serological diagnostics. Biologia 2008, 63: 1135–1142.

Suomen Hippos ry, Fintoto Oy, Suomen Hevosurheilulehti Oy. Suomen Hippos-konsernin vuosikertomus 2011. www.hippos.fi/files/4004/hippos_vk_2011_lopullinen.pdf, haettu 13.1.2015.

Suomen Hippos ry, Fintoto Oy, Suomen Hevosurheilulehti Oy. Suomen Hippos-konsernin vuosikertomus 2012. www.hippos.fi/files/6954/hippos_vuosikertomus_2012_lowres.pdf, haettu 13.1.2015.

Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) 2015a.

<http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Fastingburna-sjukdomar/Borreliosis/> luettu 6.1.2015

Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) 2015b.

<http://www.sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Fastingburna-sjukdomar/Granulocytar-anaplasmos/> luettu 6.1.2015

de Taeye SW, Kreuk L, van Dam AP, Hovius JW, Schuijt TJ. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: it takes three to tango. Trends Parasitol 2013, 29: 3.

Terveysten ja hyvinvoinnin laitos: Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta. <http://www3.thl.fi/stat/>, haettu 9.1.2015.

Troxell B ja Yang XF. Metal-dependent gene regulation in the causative agent of Lyme disease. Front Cell Infect Microbiol 2013, 3: 79.

Uehlinger FD, Clancey NP, Lofstedt J. Granulocytic anaplasmosis in a horse from Nova Scotia caused by infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Can Vet J 2011, 52: 537–540.

Valkjärvi L, Karikoski N, Mykkänen A, Tulamo R-M. Tapausselostus: *Anaplasma phagocytophilum* -tartunta hevosella. Suom Eläinlääkäril 2010, 116: 619–623.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb HN, Lu Z, Gröhn Y. Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. Vet Immunol Immunopathol 2011, 144: 374–381.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. Clin Vaccine Immunol 2012, 19: 527–535.

Wagner B, Goodman LB, Rollins A, Freer HS. Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. Equine Vet J 2013, 45: 533–537.

Wallménus K, Pettersson JHO, Jaenson TGT, Nilsson K. Prevalence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Coxiella burnetii* in adult *Ixodes ricinus* ticks from 29 study areas in central and southern Sweden. Ticks Tick Borne Dis 2012, 3: 100–106.

Vapalahti O, Vaheri A. Puutiaisaivokuumevirus. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Kustannus Oy Duodecim 2010. Verkkojulkaisu.

Wilhelmsson P, Lindblom P, Fryland L, Ernerudh J, Forsberg P, Lindgren PE. Prevalence, diversity, and load of *Borrelia* species in ticks that have fed on humans in regions of Sweden and Åland Islands, Finland with different Lyme borreliosis incidences. PLoS One 2013, 21: 8.

Wittesjö B, Bjöersdorff A, Eliasson I, Berglund J. First long-term study of the seroresponse to the agent of human granulocytic ehrlichiosis among residents of a tick-endemic area of Sweden. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001, 20: 173–178.

Woldehivet Z. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. Vet J 2008, 175: 37–77.

Woldehivet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol 2010, 167: 108–122.

Ybáñez AP, Sato F, Nambo Y, Fukui T, Masuzawa T, Ohashi N, Matsumoto K, Kishimoto T, Inokuma H. Survey on tick-borne pathogens in thoroughbred horses in the Hidaka district, Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci 2013, 75:11–15.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. Cell 1997, 89: 275–85.

Zoonosikeskus.

http://www.zoonosikeskus.fi/portal/fi/zoonositi/bakteerien_aiheuttamat_taudit/borrelioosi/, haettu 20.3.2015.

LITTEET

Liite I

VERINÄYTE BORRELIATUTKIMUKSEEN

Näytteenottopäivämäärä: / 20

Hevosen virallinen nimi:

Hevosen rotu:

Rekisterinnumero:

Syntymävuosi:

Sukupuoli:

Syntymämaa:

Hevosen kotipaikka:

Tuotu Suomeen (vuosi), jos syntynyt muualla:

Hevosen omistajan yhteystiedot:

Nimi:

Paikkakunta:

Puhelin:

Sähköposti:

Suostun siihen, että hevoseltani otetaan verinäyte tutkimustarkoitukseen. Verestä tutkitaan tarttuvien tautien vasta-aineita ja veren DNASTa voidaan tutkia erilaisia geenejä. Tulokset käsitellään luottamuksellisesti ja siten ettei yksittäistä hevosta voi tunnistaa niistä.

Päivämäärä/ paikka

Allekirjoitus

Vastaathan lomakkeen toisella puolella oleviin kysymyksiin. Kiitos avustasi!

Taustakysymyksiä:

Laiduntaako hevonen kesällä?	kyllä / ei / en tiedä
Jos kyllä, merkitse ajankohta:	maaliskuu / huhtikuu / toukokuu / kesäkuu / heinäkuu / elokuu / syyskuu / lokakuu
Liikutetaanko hevosta maastossa?	kyllä / ei / en tiedä
tarkennus: _____	
Oletko havainnut hevosessa punkkeja kesäisin?	kyllä / ei / en tiedä
tarkennus: _____	
Mikä on hevosen pääasiallinen käyttötarkoitus?	ratsu / ravuri / harrastehevonen / ratsastuskoulukäytössä / siitospeläin / muu, mikä?
Kauanko olet omistanut/tuntenut hevosen?	_____
Kuinka pitkään hevonen on asunut nykyisellä kotipaikkakunnallaan?	_____
Hevosen terveydentila	
<ul style="list-style-type: none"> - onko hevosella ollut jonkin sairauden oireita? kyllä / ei / en tiedä - tarkennus: mitä (esim. nivelvaivoja, neurologisia oireita, ähkyjä) 	

Imppaako hevonen ("nielee ilmaa")	kyllä / ei / en tiedä
Onko hevosellasi todettu:	
Kesäihottuma/hyönteisallergia	kyllä / ei / en tiedä
Mahahaava	kyllä / ei / en tiedä
Toistuvia ähkyjä	kyllä / ei / en tiedä
Krooninen hengitystiesairaus (yskä)	kyllä / ei / en tiedä
Krooninen kaviokuume	kyllä / ei / en tiedä
Jokin muu krooninen sairaus, mikä	_____
Kuinka kauan hevosellasi on (ainakin) ollut oireita tai se on impannut? Tiedätkö, minkä ikäisenä oireet ovat alkaneet? Muuta kerrottavaa?	